

512, 045

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/090667 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

A61K

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/01082

(22) Date de dépôt international : 4 avril 2003 (04.04.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/05173

24 avril 2002 (24.04.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : NEO-VACS [FR/FR]; 59, avenue Victor Hugo, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ZAGURY, Daniel [FR/FR]; 1 avenue Frédéric Le Play, F-75007 Paris (FR). LE BUANEC, Hélène [FR/FR]; 29, rue Poliveau, F-75005 Paris (FR). BIZZINI, Bernard [FR/FR]; 65, rue Roc, F-81000 Albi (FR). COHEN, Paul [FR/FR]; 21 quai de Bourbon, F-75004 Paris (FR).

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet Harlé & Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NON-IMMUNOSUPPRESSIVE IMMUNOGENIC OR VACCINE COMPOSITION COMPRISING A MUTATED E7 PROTEIN OF THE HPV-16 VIRUS

(54) Titre : COMPOSITION IMMUNOGENE OU VACCINALE NON IMMUNOSUPPRESSIVE, COMPRENANT UNE PROTEINE E7 MUTEE DU VIRUS HPV-16

(57) Abstract: The invention concerns an immunogenic or vaccine composition inducing an immune response against the native E7 protein of *Papillomavirus* HPV-16, without simultaneously inducing immunosuppression, said composition comprising, as active principle, a non-immunosuppressive mutated E7 protein comprising the amino acid sequence consisting, from the N-terminal, towards the C-terminal, of: (i) amino acid sequences 1-19 of sequence SEQ ID N°3; (ii) an amino acid sequence having (a) substitution of at least one amino acid, relative to the corresponding sequence of amino acids 20-29 of sequence SEQ ID N°3 or (b) deletion of at least four consecutive amino acids, relative to the corresponding sequence of amino acids 20-29 of sequence SEQ ID N°3; and (iii) the sequence of amino acids 30-98 of sequence SEQ ID N°3.

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition immunogène ou vaccinale induisant une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7 native du Papillomavirus HPV-16, sans induire simultanément une immunosuppression, ladite composition comprenant, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive comprenant la séquence en acides aminés qui consiste, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, en : (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ; (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3, et (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3.

WO 03/090667 A2

21 OCT 2004

**Composition immunogène ou vaccinale non immunosuppressive,  
comprenant une protéine E7 mutée du virus HPV-16.**

**DOMAINE DE L'INVENTION**

La présente invention se rapporte au domaine de la prévention ou du  
5 traitement de certains cancers associés à une infection par le Papillomavirus  
de type HPV-16.

**ART ANTERIEUR**

Plusieurs espèces de papillomavirus humain, ou HPV, sont  
10 considérées aujourd'hui comme les agents causals de cancers. En  
particulier, les HPV de types 16, 18, 31, 33 et 51 sont fréquemment associés  
aux cancers ano-génitaux, y compris le cancer du col utérin de la femme.

Plus de 50% des carcinomes squameux du col utérin sont associés au  
papillomavirus HPV de type 16.

15 Les oncoprotéines virales E6 et E7 de HPV sont fortement impliquées  
dans les mécanismes moléculaires par lesquels ces virus contribuent au  
développement de ces cancers. Ces deux oncoprotéines agissent en  
inactivant les régulateurs du cycle cellulaire que constituent la protéine p53  
et la protéine du rétinoblastome, provoquant ainsi l'événement initiateur de la  
20 progression à étapes multiples vers le cancer.

En général, les tumeurs malignes sont constituées de cellules  
cancéreuses porteuses d'antigènes associés (TAA) ou d'antigènes  
spécifiques (TSA) et d'un micro-environnement stromal particulier,  
caractérisées par une hypervascularisation, ou néoangiogénèse, qui peut  
25 être accompagnée d'une paralysie des cellules immunitaires, c'est-à-dire à  
un état d'immunosuppression. Initialement, l'immunosuppression reste  
localisée au niveau de la tumeur, puisque l'individu est encore capable de se  
défendre contre les autres agressions telles que des infections.

Cependant, avec la dissémination métastatique, l'immunosuppression  
30 peut s'étendre et se généraliser, comme l'atteste la fragilité aux infections du  
cancéreux au stade terminal. Cette immunosuppression met en jeu des  
facteurs paralysants qui sont produits par les cellules cancéreuses ou par les  
cellules de leur environnement. La paralysie locale des cellules du système  
immunitaire, ou immunosuppression, représente donc une arme majeure des

cellules cancéreuses qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

Cet état d'immunosuppression a aussi été observé dans les cancers provoqués par une infection par HPV-16. Cette immunosuppression constitue aujourd'hui un obstacle technique majeur dans la mise au point de compositions vaccinales préventives ou curatives à l'encontre des cancers provoqués par une infection par HPV-16. En effet, les stratégies vaccinales anti-HPV-16 actuelles privilégient l'induction d'une prolifération de cellules T-cytotoxiques reconnaissant spécifiquement certains antigènes produits par HPV-16, en particulier les protéines E6 et E7, lorsqu'ils sont associés aux antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) à la surface membranaire des cellules cancéreuses infectées.

Certains auteurs ont associé l'immunosuppression observée dans des cancers provoqués par HPV-16 à l'observation de niveaux d'expression réduits des molécules de classe I du MHC à la surface des cellules cancéreuses du col utérin (Cruz et al., 1999), ou encore à une réduction de l'expression de la chaîne delta du récepteur des cellules T (TCR) chez des patients exprimant une dysplasie pré-néoplasique (Muderspach et al., 2000). D'autres auteurs ont associé l'état d'immunosuppression à un défaut de réponse des cellules T à d'éventuels signaux produits par les cellules tumorales et transmis aux cellules immunitaires en provoquant leur apoptose, par exemple du fait d'une interaction Fas/Fas-ligand (Schoell et al., 1999).

D'autres auteurs ont observé que l'immunosuppression associée à un cancer provoqué par une infection par HPV était concomitante à une augmentation de IL-10 (El Sherif et al. 2001 ; Giannini et al. 1998 ; Giannini et al. 2002) et de TGF-bêta-1 (Giannini et al. 1998) ainsi qu'à une réduction de l'IFN-gamma sous-épithélial (El Sherif et al. , 2001).

Des travaux antérieurs des inventeurs relatés dans la demande internationale publiée sous le n°WO 00/03732 , ont montré que, dans le cas du cancer du col utérin provoqué par HPV, la protéine E7 du papillomavirus était impliquée dans une immunosuppression locale au niveau des tumeurs ou de cellules infectées.

L'immunosuppression induite par la protéine E7 a été caractérisée par l'inhibition de la prolifération des cellules T stimulées par le PPD ou le

toxéide tétanique, l'inhibition de la prolifération des cellules T stimulées par des cellules allogéniques, la surproduction d'IFN- $\alpha$  (cytokine immunosuppressive) par les cellules présentant l'antigène (APC). Afin de réduire ou de bloquer l'immunosuppression induite par la protéine E7 soluble de HPV, il a été proposé l'utilisation de dérivés non toxiques de la protéine E7 comme antigène en vue de l'induction d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine E7 extracellulaire. En vue de fabriquer des composés immunogènes dérivés de E7 dépourvus des effets délétères de la protéine native, il a été proposé de modifier la protéine E7 native, soit par modification chimique, soit par modification génétique, notamment en opérant des insertions, des délétions ou des substitutions de résidus d'acides aminés destinées à diminuer ou supprimer les sites fonctionnels délétères de la protéine native. Dans ce contexte, il a été décrit une protéine E7 modifiée chimiquement, dénuée d'activité immunosuppressive, après traitement de la protéine E7 native par le glutaraldéhyde.

Les modifications chimiques proposées pour réduire ou bloquer les propriétés d'immunosuppression de la protéine E7 native, telles que décrites dans l'état de la technique, visent à ajouter un groupe chimique au squelette carboné de la protéine E7 native, par couplage d'une fonction réactive de l'un des acides aminés de cette protéine avec une fonction aldéhyde, carboxamide ou maléimide, sans altération de la séquence en acides aminés de la protéine native, c'est-à-dire sans apporter de modifications significatives à la structure primaire de la protéine E7.

De fait, les diverses compositions immunogènes anti-E7 décrites dans l'état de la technique, en vue de la réalisation de préparations vaccinales préventives ou curatives à l'encontre de cancers provoqués par une infection par HPV-16, qui visent prioritairement l'induction d'une réponse immunitaire par la production de lymphocytes cytotoxiques (CTL) spécifiques de la protéine E7 exprimée à la surface des cellules infectées, contiennent, en tant qu'antigène, soit la protéine E7 complète, éventuellement modifiée chimiquement (Gérard et al., 2001) soit des peptides dérivés de la protéine E7 (Muderspach et al., 2000 ; Schoell, 1999 – précités). Dans tous les cas, y compris lorsque des peptides dérivés de la protéine E7 native sont utilisés, il n'a pas été introduit de modification dans la séquence d'acides aminés de la protéine native, et par conséquent dans la structure primaire d'acides aminés

initiale. Cela s'explique simplement par la volonté de conserver intacts les épitopes d'intérêt de la protéine E7 native afin de favoriser l'induction d'une réponse immunitaire, en particulier la production de cellules CTL, capables de reconnaître spécifiquement et efficacement la protéine E7 native produite par les cellules infectées.

Et même lorsqu'une réorganisation de la structure primaire en acides aminés de la protéine E7 est envisagée, en vue de la production d'une protéine immunogène ayant des propriétés carcinogènes, ou transformantes réduites, il est porté une grande attention à la conservation d'au moins une copie complète de la séquence d'acides aminés de la protéine E7 native au sein du composé immunogène réarrangé, afin de maintenir présent, au sein dudit composé immunogène, l'ensemble des épitopes potentiels de la protéine E7 native.

Ainsi, Osen et al. (2001) ont décrit la construction d'un ADN codant un composé immunogène susceptible d'induire la production de lymphocytes cytotoxiques (CTL) reconnaissant spécifiquement la protéine E7 native exprimée à la surface des cellules cancéreuses infectées par HPV-16, dans une stratégie vaccinale anti-HPV avec de l'ADN, et non directement avec un composé immunogène peptidique. Afin d'éviter tout événement de recombinaison qui pourrait aboutir à une surproduction de protéine E7 native, ou tout au moins d'une protéine recombinée possédant les propriétés carcinogènes de la protéine E7 native, ces auteurs ont construit un ADN codant pour une protéine immunogène dans laquelle l'ensemble des épitopes de la protéine E7 native est représenté, bien que chacun des domaines peptidiques, respectivement (i) domaine 1-10, (ii) domaine 11-40, (iii) domaine 41-70 et (iv) domaine 71-98, aient été intervertis dans le composé peptidique immunogène final. Ces auteurs insistent sur la nécessité de produire un composé peptidique immunogène ayant conservé tous les épitopes CTL potentiels de la protéine E7 native, tout en ayant simultanément perdu ses propriétés de transformation cancéreuses des cellules. En dernier lieu, ces auteurs suggèrent d'accroître encore l'innocuité du composé peptidique immunogène réarrangé, en ce qui concerne son pouvoir cancérigène, en supprimant le domaine de liaison de la protéine E7 native à la protéine pRB du rétinoblastome, allant de l'acide aminé 21 à l'acide aminé 26 de E7, responsable de l'activité carcinogène de la protéine

E7 native. Toutefois, ce mode de réalisation d'un composé peptidique immunogène non carcinogène n'a pas été concrètement réalisé.

### **DESCRIPTION DE L'INVENTION**

5 De manière surprenante, il a désormais été montré selon l'invention qu'il pouvait être obtenu, par mutagenèse dirigée de l'ADN codant la protéine E7 native, une protéine mutée possédant une capacité identique, voire une capacité améliorée, à induire une réponse immunitaire spécifique à l'encontre de la protéine E7 native, et dans laquelle ont été bloquées les propriétés d'immunosuppression de la protéine E7 native.

10 Il a ainsi été montré pour la première fois selon l'invention, de manière surprenante, qu'un fragment peptidique localisé dans la région allant de l'acide aminé en position 20 (Thr ou T) jusqu'à l'acide aminé en position 29 (Asn ou N) de la protéine E7 native du Papillomavirus HPV-16 était responsable de l'activité immunosuppressive de cette protéine.

15 Aux fins de la présente description, une protéine qui diffère d'au moins un acide aminé, par rapport à la protéine E7 native de HPV-16 de séquence SEQ ID N°3, est désignée comme une protéine E7 « mutée » selon l'invention, lorsque la ou les différences en acides aminés sont localisées dans la région peptidique correspondante 20-29 de la protéine E7 native de séquence SEQ ID N°3.

20 En particulier, il a été montré selon l'invention qu'une protéine E7 mutée qui comprend la substitution d'au moins un acide aminé, de préférence d'au moins deux acides aminés, par rapport à la séquence SEQ ID N°3 de la protéine E7 native, a perdu la propriété d'induire l'immunosuppression qui avait été rapportée antérieurement pour la protéine E7 native. On a ainsi montré qu'une protéine E7 mutée comprenant la substitution du résidu acide cystéine en position 24 par un résidu de glycine (CYS24GLY) et la substitution du résidu d'acide glutamique en position 26 par un résidu glutamine (GLU26GLN), par rapport à la séquence SEQ ID N°3 de la protéine E7 native, a perdu la propriété immunosuppressive de la protéine E7 native. De même, on a montré qu'une protéine E7 mutée

comprenant la substitution du résidu cystéine en position 24 par un résidu de sérine (CYS24SER) et la substitution du résidu d'acide glutamique en position 26 par un résidu de glutamine (GLU26GLN), par rapport à la séquence SEQ ID N°3 de la protéine E7 native, a perdu la propriété immunosuppressive de la protéine E7 native.

On a aussi montré selon l'invention qu'une protéine E7 mutée qui comprend, par rapport à la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3 de la protéine E7 native, une délétion d'au moins quatre, et de préférence une délétion de quatre, cinq, six, sept, huit, neuf ou dix acides aminés consécutifs dans la région polypeptidique correspondante de la séquence SEQ ID N°3 allant de l'acide aminé en position 20 jusqu'à l'acide aminé en position 29, selon la numérotation de la séquence SEQ ID N°3, a perdu la propriété immunosuppressive observée pour la protéine E7 native.

En particulier, on a montré que la protéine E7 mutée comprenant la délétion du fragment peptidique 21(Asp ou D) à 26( Glu ou E), selon la numérotation de la séquence SEQ ID N°3, a perdu la propriété immunosuppressive observée pour la protéine E7 native. La protéine E7 mutée dont la région correspondant aux acides aminés 21 à 26 de la protéine E7 native est délétée est aussi désignée comme la protéine E7 $\Delta$ 21-26 aux fins de la présente description.

En tant que telle, la protéine E7 $\Delta$ 21-26, produite par recombinaison génétique, a été décrite par D'Anna et al. (2001, J. Natl. Cancer Inst . Vol. 93 (24): 1843-1851).

De même, on a montré que la protéine E7 mutée comprenant la délétion du fragment peptidique 21(Asp ou D) à 25( Tyr ou Y), selon la numérotation de la séquence SEQ ID N°3, a perdu la propriété immunosuppressive observée pour la protéine E7 native. La protéine E7 mutée dont la région correspondant aux acides aminés 21 à 25 de la protéine E7 native est délétée est aussi désignée comme la protéine E7 $\Delta$ 21-25 aux fins de la présente description.

Il est donc montré selon l'invention que de simples substitutions d'acides aminés dans la région peptidique 20-29 de la protéine E7 native permettent de bloquer l'activité immunosuppressive observée pour cette protéine. Ainsi, des altérations minimales de la structure primaire de la protéine E7 native, dans la région peptidique 20-29, détruisent les propriétés immunosuppressives caractéristiques de la protéine E7 native.

Selon l'invention, une protéine est « immunosuppressive » lorsque cette protéine inhibe d'au minimum 60%, et de préférence d'au moins 70%, la prolifération *in vitro* de cellules mononucléées provenant du sang périphérique humain d'un individu vacciné contre le tétanos (Antigène tétanos toxoïde) et/ou la diphtérie (antigène du type « tuberculin-Purified Protein Derivative » ou « PPD »), ladite prolifération des cellules mononucléées étant induite par pré-incubation de ces cellules avec (i) l'antigène PPD, (ii) avec l'antigène tétanus toxoïde, (iii) avec une association de l'antigène PPD et de l'antigène tétanus toxoïde, ou encore (iv) avec des cellules allogéniques vis-à-vis desdites cellules mononucléées. Dans ce test, la protéine potentiellement immunosuppressive est utilisée à la concentration induisant la valeur maximale d'inhibition de prolifération, selon une courbe d'effet-dose. Une illustration d'un tel test donnée à l'exemple 6.

Egalement, une protéine est « immunosuppressive » lorsque cette protéine induit un niveau de production *in vitro* anormal de cytokines immunosuppressives, respectivement l'IL-10 par les cellules mononucléées du sang périphérique, et l'IFN- $\alpha$  ou l'IL-10 par les cellules présentant l'antigène (APC).

De plus, comme cela sera précisé plus loin dans la description, et comme cela est illustré dans les exemples, les protéines E7 mutées ci-dessus possèdent toutes en commun, en plus de leur caractère non immunosuppressif, également la capacité de stimuler la production d'anticorps « neutralisants » vis-à-vis de la protéine E7 native, c'est à dire la production d'anticorps qui reconnaissent la protéine E7 native et qui bloquent l'activité immunosuppressive de la protéine E7 native, délétère pour les



cellules du système immunitaire. Selon l'invention, un anticorps anti-E7 est dit « neutralisant », notamment lorsqu'il bloque la capacité de la protéine E7 native à stimuler la production de TNF- $\alpha$  par des macrophages humains prétraités par de l'IFN- $\gamma$ , selon le test décrit en détail à l'exemple 1.

5 Ces résultats ont permis de définir une famille de protéines E7 mutées qui ont toutes en commun de posséder des mutations, substitution(s) ou délétion d'acides aminés, par rapport à la séquence d'acides aminés de la protéine E7 native.

De manière générale, par protéine « E7 mutée » non  
10 immunosuppressive selon l'invention, on entend une protéine qui comprend la séquence en acides aminés qui consiste, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, en :

- (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ;
- (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au  
15 moins un, et de préférence d'au moins deux acides aminés, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ; et
- 20 - (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3.

Selon l'invention, une protéine E7 mutée qui « comprend » la séquence en acides aminés telle que définie ci-dessus est une protéine dont la séquence en acides aminés « consiste essentiellement » en la séquence d'acides aminés ci-dessus. En d'autres termes, une protéine E7 mutée selon  
25 l'invention peut comprendre, en plus de la séquence d'acides aminés ci-dessus, également une ou deux séquence(s) d'acides aminés additionnelle(s) d'au plus 20, avantageusement d'au plus 15, préférentiellement d'au plus 10, et de manière tout à fait préférée d'au plus 6 acides aminés, la ou les séquence(s) d'acides aminés additionnelle(s) étant  
30 localisée(s) respectivement à l'extrémité N-terminale de la région (i) ou à l'extrémité C-terminale de la région (ii), et dans certains cas à la fois à

l'extrémité N-terminale de la région (i) et à l'extrémité C-terminale de la région (ii). Dans le dernier cas, la séquence additionnelle localisée à l'extrémité N-terminale de la région (i) peut être distincte de la séquence additionnelle localisée à l'extrémité C-terminale, ou au contraire les deux séquences additionnelles peuvent être identiques. En général, une protéine E7 mutée selon l'invention comprend, par rapport à la séquence d'acides aminés ci-dessus qui la définit, une seule séquence d'acides aminés additionnelle, telle qu'une séquence d'acides aminés poly(histidine), par exemple une séquence consistant en un polymère de six résidus histidine.

Il résulte de la définition qui précède qu'une protéine E7 mutée selon l'invention possède deux régions d'acides aminés identiques aux régions peptidiques correspondantes de la séquence SEQ ID N°3, respectivement la région (i) d'acides aminés identique à la région peptidique 1-19 de la protéine E7 native de séquence SEQ ID N°3, et la région (iii) d'acides aminés identique à la région peptidique 30-98 de la protéine E7 native de séquence SEQ ID N°3. La région (ii) d'acides aminés centrale de la protéine E7 mutée comprend une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé, ou alternativement comprend une délétion d'au moins quatre acides aminés, par rapport à la région peptidique 20-29 correspondante de la séquence SEQ ID N°3.

Selon la première alternative, la région (ii) d'acides aminés d'une protéine E7 mutée comprend de préférence au moins deux substitutions de nucléotides, et peut comprendre trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf ou dix substitutions d'un acide aminé, par rapport aux acides aminés correspondants de la région peptidique 20-29 de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine native. Dans le mode de réalisation dans lequel la région (ii) d'acides aminés de la protéine E7 mutée comprend dix substitutions d'acides aminés, la région (ii) d'acides aminés de la protéine E7 mutée est totalement distincte de la région peptidique correspondante 20-29 de la protéine E7 native de séquence SEQ ID N°3.

Chaque substitution d'un acide aminé, dans la région 20-29 de la protéine E7 native, pour obtenir une protéine E7 mutée selon l'invention, est préférentiellement réalisée de manière à ce que l'acide aminé substitué dans la protéine E7 mutée appartienne à une « classe » distincte de l'acide aminé correspondant de la protéine E7 native, parmi les classes des acides aminés respectivement aromatiques, hydrophobes, polaires, basiques, acides, ou des petits acides aminés, avantageusement comme suit :

- résidu Thr en position 20 remplacé par un résidu autre que Ala, Ser, Met et Gly ;
- résidu Asp en position 21 remplacé par un résidu autre que Glu ;
- résidu Leu en position 22 remplacé par un résidu autre que Ile et Val ;
- résidu Tyr en position 23 remplacé par un résidu autre que Phe et Trp ;
- résidu Cys en position 24 remplacé par tout résidu d'acide aminé distinct ;
- résidu Tyr en position 25 remplacé par un résidu autre que Phe et Trp ;
- résidu Glu en position 26 remplacé par un résidu autre que Asp ;
- résidu Gln en position 27 remplacé par un résidu autre que Asn ;
- résidu Leu en position 28 remplacé par un résidu autre que Ile et Val ; et
- résidu Asn en position 29 remplacé par un résidu autre que Gln.

L'ensemble des acides aminés est constitué des acides aminés suivants : Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val, ainsi que leurs dérivés chimiquement modifiés sur un ou plusieurs groupes chimiques ne participant pas à leur liaison avec un autre acide aminé dans la séquence d'une protéine E7 mutée selon l'invention.

Une famille préférée de protéines E7 mutées consiste en la famille de protéines dont les résidus Cys en position 24 et Glu en position 26 ont été substitués.

Une première protéine E7 mutée particulièrement préférée comprenant deux substitutions d'un nucléotide est la protéine E7 (CYS24GLY, GLU26GLN).

Une seconde protéine E7 mutée particulièrement préférée comprenant deux substitution d'un nucléotide est la protéine E7 (CYS24SER, GLU26GLN)

Selon la seconde alternative, la région (ii) d'acides aminés comprend  
5 la délétion de cinq, six, sept, huit, neuf ou dix acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3. Lorsque la région (ii) d'acides aminés comprend la délétion de dix acides aminés, ladite région (ii) ne comprend aucun acide aminé et la protéine E7 mutée résultante consiste, de l'extrémité N-terminale vers  
10 l'extrémité C-terminale, en la région (i) 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 qui est directement liée par une liaison peptidique à la région (iii) 30-98 de la séquence SEQ ID N°3.

Une première famille préférée de protéines E7 mutées selon la seconde alternative ci-dessus est la famille de protéines qui comprennent la  
15 délétion de six acides aminés consécutifs dans la région (ii), par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3.

Une troisième protéine E7 mutée préférée selon l'invention consiste en la protéine dont la séquence d'acides aminés comprend la délétion des  
20 acides aminés 21 à 26 correspondants de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine E7 native. Cette protéine E7 mutée, aussi désignée E7 $\Delta$ 21-26, possède la séquence d'acides aminés SEQ ID N°1 et est codée par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°2. La région (ii) de la protéine E7 $\Delta$ 21-26 possède la délétion de six acides aminés consécutifs, par rapport à la  
25 séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3.

Une seconde famille préférée de protéines E7 mutées selon la seconde alternative ci-dessus est la famille de protéines qui comprennent la  
30 délétion de cinq acides aminés consécutifs dans la région (ii), par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3.

Une quatrième protéine E7 mutée préférée selon l'invention consiste en la protéine dont la séquence d'acides aminés comprend la délétion des acides aminés 21-25 correspondants de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine E7 native. Cette protéine E7 mutée, aussi désignée E7 $\Delta$ 21-25 dans  
5 la présente description. La région (ii) de la protéine E7 $\Delta$ 21-25 possède la délétion de cinq acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3

Il est montré selon l'invention que le produit d'expression de l'ADN codant une protéine E7 mutée de HPV-16 telle que définie ci-dessus,  
10 lorsqu'il est combiné à un adjuvant de l'immunité approprié, est capable de générer chez la souris une réponse humorale et cellulaire spécifique, permettant ainsi d'induire une immunité anti-tumorale protectrice, comparable sinon supérieure, à celle induite par la protéine E7 native.

Par « produit d'expression » de l'ADN codant la protéine E7 mutée, on  
15 entend selon l'invention la ou les protéines résultant de la traduction de l'ADN ( ou de l'ARN messenger correspondant) codant la protéine E7 mutée définie ci-dessus, dans une cellule hôte.

De plus, il est montré que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de HPV-16 selon l'invention possède une activité  
20 thérapeutique anti-tumorale égale ou supérieure à celle de la protéine E7 native.

En outre, un caractère essentiel du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de l'invention, consiste, d'une part, en l'absence d'activité immunosuppressive directe de ce dernier et, d'autre part, en  
25 l'induction d'un blocage de l'immunosuppression induite par la protéine E7 native sécrétée par les cellules cancéreuses.

La présente invention a pour objet une composition immunogène induisant une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7 native du Papillomavirus HPV-16, sans induire simultanément une  
30 immunosuppression, comprenant, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive telle que définie ci-dessus dans la présente description, le cas échéant en association avec un ou plusieurs excipients ou adjuvants de l'immunité physiologiquement compatible.

L'invention est aussi relative à une composition vaccinale dépourvue de propriété immunosuppressive, préventive ou curative à l'égard d'un cancer provoqué par une infection à *Papillomavirus*, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive telle que définie ci-dessus dans la présente description, en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.

La présente invention concerne aussi l'utilisation d'une protéine E7 mutée non immunosuppressive telle que définie ci-dessus, pour la fabrication d'une composition immunogène ou d'une composition vaccinale non immunosuppressive et qui induit la production d'anticorps neutralisant l'activité immunosuppressive de la protéine E7 native.

Comme cela est illustré dans les exemples, une composition immunogène ou une composition vaccinale selon l'invention induit une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique à l'encontre des cellules qui expriment la protéine E7 native, ou un peptide dérivé de la protéine E7 native. En particulier, il est montré dans les exemples qu'une composition immunogène ou une composition vaccinale selon l'invention induit une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique à l'encontre de cellules tumorales exprimant la protéine E7 native, ou un peptide dérivé de la protéine E7 native.

La séquence en acides aminés de référence de la protéine E7 native de HPV-16 est, par exemple, la séquence décrite par Seedorf et al. (1985) dont le numéro d'accès dans la base de données Swissprot est N°P03129, et qui est reproduite dans la présente description comme la séquence SEQ ID N°3. L'acide nucléique codant la protéine E7 native de HPV-16 comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°4.

Une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description peut être préparée par toute technique conventionnelle de synthèse d'une protéine, bien connue de l'homme du métier.

Par exemple, une protéine E7 mutée peut être préparée par la technologie de l'ADN recombinant, par exemple par surexpression de l'acide nucléique codant celle-ci dans un système de cellules bactériennes

recombinées, telles que des cellules de *E. coli* recombinées, comme décrit par Kiefer et al. (1996) et Tucker et al. (1996).

Une protéine E7 mutée peut aussi être préparée par voie de synthèse chimique, soit en solution homogène, soit en phase solide. Une première  
5 illustration d'une technique appropriée de synthèse chimique est par exemple celle décrite par Houben Weyl (1974).

Egalement, une protéine E7 mutée peut être préparée par une technique de synthèse chimique en solution ou en phase solide par des couplages successifs des différents résidus d'acides aminés qui doivent être  
10 incorporés (à partir de l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale en phase liquide, ou de l'extrémité C-terminale jusqu'à l'extrémité N-terminale en phase solide), technique de synthèse dans laquelle les extrémités N-terminales et les chaînes latérales des résidus d'acides aminés sont préalablement bloqués par des groupes chimiques protecteurs  
15 appropriés. Une illustration d'une technique qui peut être utilisée pour synthétiser une protéine E7 mutée est celle décrite par Merrifield (1965a ; 1965b).

#### **Acides nucléiques utilisés selon l'invention**

20 Selon l'invention, une protéine E7 mutée peut être produite par traduction d'un acide nucléique codant ladite protéine E7 mutée, par exemple par un acide nucléique codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1 .

De préférence, tout acide nucléique et tout polypeptide selon  
25 l'invention se présentent sous une forme isolée ou purifiée.

Le terme « purifié » ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative. Un polynucléotide ou un polypeptide est à l'état purifié après une purification du matériel de départ ou du matériel  
30 naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement 4 ou 5 ordres de grandeur.

Les termes « acide nucléique », « polynucléotide », « oligonucléotide » ou encore « séquence nucléotidique » englobe des séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN d'au moins deux nucléotides, indifféremment sous la forme simple  
5 brin ou sous la forme de duplex.

Le terme « nucléotide » désigne à la fois les nucléotides naturels (A, T, G, C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent au moins une modification telle que (i) un analogue d'une purine, (ii) un analogue d'une pyrimidine, ou (iii) un sucre analogue, de tels nucléotides modifiés étant  
10 décrits par exemple dans la demande PCT N° WO 95/0 4064.

Aux fins de la présente invention, un premier nucléotide est considéré comme étant « complémentaire » d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les bases  
15 complémentaires sont A et T ( ou A et U), et C et G.

Selon un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1 comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°2.

Un acide nucléique tel que défini ci-dessus est utile principalement lorsqu'il est mis en œuvre pour la production du produit d'expression  
20 correspondant.

En conséquence, l'acide nucléique codant la protéine E7 mutée comprend, de préférence, un polynucléotide régulateur contrôlant l'expression de la protéine E7 mutée dans une cellule hôte procaryote ou  
25 eucaryote.

Le polynucléotide régulateur comprend au moins une séquence promoteur capable d'initier la transcription de l'ADN codant une protéine E7 mutée dans la cellule hôte choisie. Ce polynucléotide régulateur peut aussi  
30 comprendre d'autres séquences nucléotidiques favorisant l'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée, par exemple des séquences activatrices de la transcription bien connues de l'homme du métier.

Préférentiellement, on choisira un promoteur dit « inductible », c'est-à-dire un promoteur sensible à la présence d'un composé inducteur, ledit



promoteur dirigeant la transcription de l'ADN placé sous son contrôle uniquement en présence du composé inducteur.

Le promoteur LacZ est un exemple illustratif d'un tel promoteur inducible.

5 Selon l'invention, toute technique classique de biologie moléculaire, de microbiologie et d'ADN recombinant connue de l'homme du métier peut être utilisée afin de préparer un acide nucléique tel que défini ci-dessus. De telles techniques sont décrites par exemple par Sambrook et al. (1989). Glover (1985), Gait (1984) et Ausubel et al. (1989).

10 L'acide nucléique comprenant un ADN codant une protéine E7 mutée selon l'invention, placé sous le contrôle d'un polynucléotide régulateur tel que défini ci-dessus est inclus dans une cassette d'expression.

### **Cassettes d'expression**

15

Une telle cassette d'expression peut comprendre, outre le polynucléotide régulateur de l'ADN codant la protéine E7 mutée, des séquences non traduites localisées du côté 5' du cadre ouvert de lecture, dites séquences « leader », capables d'augmenter la traduction du produit d'expression, ou des séquences dites « terminateur » bien connues de l'homme du métier.

20 De manière tout à fait préférée, une cassette d'expression telle que définie ci-dessus comprend en outre une séquence codant pour un peptide signal en vue de la production d'un polypeptide de fusion entre ledit peptide signal et la protéine E7, mutée, par exemple entre ledit peptide signal et la protéine E7 $\Delta$  21-26, afin de favoriser la sécrétion du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée et retrouver celui-ci principalement à l'extérieur des cellules, par exemple dans le surnageant de culture cellulaire. De préférence, la séquence nucléotidique codant le peptide signal est localisée immédiatement du côté 5' de la séquence nucléotidique codant la protéine E7 mutée.

25 30 En général, une cassette d'expression telle que définie ci-dessus comprend en outre un polynucléotide marqueur de sélection, par exemple le gène *his*, afin de sélectionner positivement les cellules hôtes transformées par celle-ci.

35

### **Vecteurs recombinants**

L'acide nucléique codant une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, le cas échéant après insertion dans une cassette d'expression, est préférentiellement introduit dans un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, qui comprend ledit acide nucléique ou ladite cassette d'expression, tels que définis ci-dessus.

Par « vecteur » au sens de la présente invention, on entend une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme simple brin ou double brin.

Un vecteur recombinant est indifféremment un vecteur de clonage ou un vecteur d'expression.

Il peut s'agir d'un vecteur d'origine bactérienne ou virale.

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs Pbr322 (ATCC37017) ou encore des vecteurs tels que PAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, Etats-Unis).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pWE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, p NH8A, p NH16A, p NH18A, p NH46A, p WLNEO, p SV2CAT, p OG44, pXTI, pSG (Stratagene).

Selon un premier mode de réalisation, un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus est utilisé afin d'amplifier l'acide nucléique ou la cassette d'expression qui y est insérée, après transformation ou transfection de l'hôte cellulaire désiré.

Selon un second mode de réalisation, il s'agit d'un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique ou une cassette d'expression tels que définis ci-dessus, en vue de la transformation d'une cellule hôte choisie pour la production du produit d'expression de l'ADN codant une protéine E7 mutée selon l'invention.

Un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus comprend avantageusement aussi des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriée.

Une cassette d'expression telle que définie ci-dessus constitue un mode de réalisation particulier d'un vecteur recombinant selon l'invention.

Pour permettre l'expression de l'acide nucléique codant une protéine E7 mutée selon l'invention, un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus doivent être introduits dans une cellule hôte.

#### **Cellules hôtes recombinantes**

Pour mettre en œuvre certains modes de production d'une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, on a avantageusement recours à une cellule hôte transformée par un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus.

La cellule hôte transformée est avantageusement une cellule bactérienne, telle qu'une cellule de *E. coli*, ou encore une cellule de levure, telle qu'une cellule de *Saccharomyces cerevisiae*.

Une telle cellule hôte transformée est avantageusement une cellule eucaryote.

Une catégorie de cellules hôtes recombinantes préférées sont les cellules de mammifères, telles que des cellules de souris, transformées par un acide nucléique, une cassette d'expression ou encore un vecteur recombinant selon l'invention.

#### **Procédé d'obtention d'un acide nucléique codant la protéine E7 $\Delta$ 21-26.**

L'invention décrit également un procédé pour la fabrication d'un acide nucléique codant une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

(a) réaliser une mutagenèse dirigée de l'acide nucléique codant la protéine E7 native, par amplification dudit acide nucléique à l'aide respectivement d'une première amorce nucléotidique et d'une seconde amorce nucléotidique hybridant avec l'extrémité 3' de l'ADN codant la protéine E7 native .

(b) récupérer l'ADN amplifié.

La première amorce nucléotidique comprend, dans sa séquence, la suite de codons codant pour les mutations que l'on souhaite insérer dans la séquence d'acides aminés de la protéine E7 native de départ.

Ainsi, si l'on souhaite préparer une protéine E7 mutée dont la région (ii) comprend une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé, la séquence de la première amorce est telle qu'elle contient les codons appropriés codant pour le ou les acides aminés qui sont remplacés.

5 Si, selon une autre alternative, on souhaite préparer une protéine E7 mutée dont la région (ii) comprend la délétion de quatre, cinq, six, et, huit, neuf ou dix acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3, alors la première amorce comprend, dans sa séquence, un premier codon codant  
10 pour l'acide aminé localisé immédiatement du côté N-terminal du fragment peptidique à déléter, lequel premier codon précède immédiatement un second codon, ledit second codon codant pour l'acide aminé localisé immédiatement du côté N-terminal du fragment peptidique à déléter.

L'utilisation de la première amorce permet l'obtention d'un produit final  
15 d'amplification dans lequel les codons désirés ont été modifiés, lequel produit final d'amplification code la protéine E7 mutée désirée.

La seconde amorce nucléotidique utilisée à l'étape (a) d'amplification peut comprendre, outre une séquence hybridant avec l'extrémité 3' de l'ADN codant la protéine E7 native, également un ou plusieurs sites de  
20 reconnaissance par des endonucléases.

L'acide nucléique codant la protéine E7 mutée est inséré dans un vecteur de clonage ou dans un vecteur d'expression, à un site d'insertion prédéterminé, par exemple par ligation dudit acide nucléique avec l'acide nucléique du vecteur, après avoir préalablement ouvert le vecteur hôte, par  
25 exemple par coupure nucléotidique à l'aide d'une endonucléase de restriction, de préférence au niveau d'un polysite de clonage.

30 L'invention a pour objet une composition comprenant la protéine E7 mutée, telle que définie dans la présente description, et préférentiellement une composition immunogène ou une composition vaccinale comprenant ladite protéine E7 mutée.

**Compositions comprenant la protéine E7 mutée non immunosuppressive de l'invention.**

L'invention a pour objet toute composition comprenant une protéine  
5 E7 mutée non immunosuppressive selon l'invention, telle que la protéine E7  
mutée comprenant la séquence en acides aminés de séquence SEQ ID N°1.

L'invention a également pour objet toute composition comprenant le  
produit d'expression de l'ADN codant une protéine E7 mutée selon  
l'invention, telle que la protéine E7 $\Delta$ 21-26 de séquence SEQ ID N°2.

10 On a montré selon l'invention qu'une protéine E7 mutée telle que  
définie dans la présente description est dépourvue de propriété  
immunosuppressive, comme cela est illustré dans les exemples.

En particulier, on a montré que la protéine E7 $\Delta$ 21-26 n'induisait  
aucune immunosuppression laquelle est administrée à un mammifère, en  
15 association avec un adjuvant de l'immunité approprié.

On a aussi montré que les protéines E7 mutées, respectivement la  
protéine E7(CYS24GLY, GLU26GLN) et la protéine E7 (CYS24SER,  
GLU26GLN), n'induisaient aucune immunosuppression lorsqu'elles sont  
administrées à un mammifère, en association avec un adjuvant de l'immunité  
20 approprié.

Comme cela a déjà été précisé succinctement précédemment, le  
produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de séquence  
SEQ ID N°1 induit une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7  
native au moins du même ordre que la réponse immunitaire induite par la  
25 protéine E7 native elle-même, Et la protéine E7 mutée selon l'invention est  
dépourvue, sur les cellules immunitaires humaines, des propriétés  
immunosuppressives qui caractérisent notamment la protéine E7 native.

L'invention a donc encore pour objet une composition pharmaceutique  
préventive ou curative d'une infection par HPV-16, et plus spécifiquement  
30 d'un cancer induit par une infection par HPV-16, caractérisée en ce qu'elle  
comprend, à titre de principe actif, le produit d'expression de l'ADN codant la  
protéine E7 mutée telle que définie ci-dessus, le cas échéant en association  
avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

De préférence, ladite composition pharmaceutique se présente sous  
35 une forme adaptée à l'administration d'une quantité hebdomadaire allant de

10 à 1000 µg de la protéine E7 mutée, ou du produit d'expression de l'ADN codant celle-ci.

Il est montré selon l'invention que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1, lorsqu'il est administré en combinaison avec un adjuvant de l'immunité approprié, est capable de générer une réponse immunitaire humorale et cellulaires dirigée contre la protéine E7 native permettant ainsi d'induire une immunité préventive à l'encontre des tumeurs. De plus, l'immunité protectrice induisant un état de résistance anti-tumorale provoquée par l'administration du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée est égale ou supérieure à celle qui est obtenue après immunisation préalable avec la protéine E7 native.

Il a aussi été montré que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1 est capable d'induire une immunité anti-tumorale thérapeutique, lorsque cette protéine est administrée, en association avec un adjuvant de l'immunité appropriée, à un individu ayant déjà développé des tumeurs. La réponse immunitaire anti-tumorale thérapeutique induite par le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée est significativement supérieure à celle qui peut être obtenue après administration de la protéine E7 native.

De tels résultats sont illustrés à l'exemple 3 où il est montré, dans un modèle murin, que l'immunité thérapeutique anti-tumorale induite par le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée permet d'allonger la durée de vie moyenne des animaux de 1,5 fois, par rapport à la durée de vie moyenne des animaux chez lesquels on a administré la protéine E7 native.

Il a également été montré que l'immunité antitumorale préventive de l'immunité antitumorale thérapeutique induite par le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée était due à l'induction simultanée d'une réponse immunitaire humorale et cellulaires spécifique.

Ainsi, les résultats des exemples montrent qu'une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, est capable d'induire une immunité humorale systémique à l'encontre de la protéine E7 native. Il a en particulier été montré qu'un haut niveau d'anticorps anti-E7 d'isotype IgG était produit, principalement des anticorps d'isotypes IgG2b et IgG1.

De plus, l'administration d'une protéine E7 mutée selon l'invention à un individu, dans les conditions appropriées, permet aussi d'induire une immunité de type mucosal, comme en témoignent le haut niveau de réponse anticorps d'isotype IgA présenté à l'exemple 3.

5 De plus, selon une caractéristique essentielle de la protéine E7 mutée, cette protéine qui est elle-même dépourvue de l'activité immunosuppressive directe de la protéine E7 native, permet aussi de bloquer l'activité immunosuppressive de la protéine E7 soluble sécrétée par les cellules cancéreuses, du fait du caractère neutralisant des anticorps produits après  
10 immunisation avec la protéine E7 mutée, comme en témoignent les résultats de l'exemple 2.

Les résultats des exemples montrent également qu'une protéine E7 mutée selon l'invention permet la prolifération de cellules TCD4+ et TCD8+ reconnaissant spécifiquement la protéine E7 native, cette prolifération  
15 cellulaire étant accompagnée par une surproduction de la cytokine IFN- $\gamma$ .

L'invention est également relative à une composition immunogène induisant une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7 native du Papillomavirus HPV-16, sans induire simultanément une immunosuppression, ladite composition comprenant, à titre de principe actif,  
20 une protéine E7 mutée non immunosuppressive dont la séquence en acides aminés consiste, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, en :

- (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ;
- (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante d'acides  
25 aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ; et
- (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3,

en association avec un ou plusieurs excipients ou adjuvants de l'immunité  
30 physiologiquement compatibles.

Une telle composition immunogène peut être utilisée de manière préventive, dans l'objectif d'induire une immunité anti-tumorale protectrice vis-à-vis d'une infection par HPV-16.

Une telle composition immunogène peut également être utilisée à titre  
5 thérapeutique ou curatif d'une infection par HPV-16, en particulier d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16.

L'invention concerne également l'utilisation d'une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, ou pour la fabrication d'une composition  
10 immunogène telle que décrite ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un procédé pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, ou d'une composition immunogène, destinée à induire une immunité protectrice préventive ou une immunité thérapeutique à l'encontre d'un cancer provoqué par une infection  
15 par HPV-16, tout en bloquant l'état d'immunosuppression induit par la protéine E7 native, caractérisé en ce qu'il comporte une étape au cours de laquelle une protéine E7 mutée telle que définie ci-dessus est combiné avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.

L'invention est également relative à une composition vaccinale  
20 préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection à papillomavirus caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive dont la séquence en acides aminés consiste, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, en :

- (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ;
  - 25 - (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ; et
  - 30 - (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3,
- en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.



Afin de lutter contre l'immunosuppression locale au niveau des cellules cancéreuses infectées par HPV-16, qui est induite par la protéine E7 extracellulaire, puis de stimuler une réponse immunitaire efficace à l'encontre de ces cellules cancéreuses, qui présentent à leur surface membranaire la protéine E7 native, ou des peptides dérivés de la protéine E7 native après maturation intracellulaire, en association avec un antigène de classe I du MHC, il est important d'induire la production d'anticorps, notamment d'anticorps de l'isotype IgG, capables de neutraliser l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 soluble sécrétée par les cellules cancéreuses infectées par le virus HPV-16. De plus, il est essentiel d'induire simultanément la production de lymphocytes cytotoxiques (CTL) capables de reconnaître spécifiquement la protéine E7 native, ou un peptide qui en est dérivé, exposé à la surface membranaire des cellules cancéreuses, afin de détruire ces cellules. Pour atteindre ces objectifs, il est nécessaire d'induire une réponse immunitaire de type systémique.

De plus, les papillomavirus humains étant détectés principalement dans les cancers des muqueuses, en particulier les cancers ano-génitaux, y compris le cancer du col utérin chez la femme, il est important de compléter les effets préventifs ou thérapeutiques de l'induction d'une réponse immunitaire de type systémique par l'induction d'une réponse immunitaire de type mucosal, notamment en stimulant la production d'anticorps d'isotype IgA au niveau local, sur les muqueuses.

Selon les objectifs poursuivis, on utilise des adjuvants de l'immunité capable d'orienter la réponse vers une immunité systémique ou mucosale.

Parmi les adjuvants de l'immunité systémique, on utilise de préférence les adjuvants de type IFA (adjuvant incomplet de Freund), le phosphate de calcium ou l'hydroxyde d'alumine. On peut aussi utiliser l'adjuvant QuilA, commercialisé par Brenntag Biosector, Danemark. Parmi les adjuvants de l'immunité mucosale, on utilise de préférence des adjuvants comme la cholératoxine B (CTB) ou encore un mutant de la toxine LT (LT $\mu$ ), bien connus de l'homme du métier.

L'induction d'une réponse immunitaire de type systémique et/ou de type mucosal est aussi influencée par la voie d'administration de la composition vaccinale de l'invention.

Ainsi, l'administration de la composition vaccinale par voie parentérale, sous-cutanée ou intradermique favorisera l'induction d'une réponse immunitaire systémique, accompagnée le cas échéant également d'une réponse immunitaire mucosale.

5 L'administration de la composition vaccinale selon l'invention au niveau local, par exemple par instillation nasale ou encore par application locale à la surface des muqueuses, favorisera l'induction d'une réponse immunitaire de type mucosal.

10 La présente invention a également pour objet une méthode de traitement préventif ou curatif d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16 caractérisée en ce qu'elle comporte une étape au cours de laquelle on administre aux patients une quantité immunologiquement efficace d'une composition vaccinale telle que définie dans la présente description.

15 De préférence, on administre à un patient, sous une forme adaptée à l'administration systémique et/ou mucosale, une composition vaccinale de l'invention en quantité suffisante pour être efficace sur le plan préventif ou thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. La dose administrée de la protéine E7 mutée, ou du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée, peut aller par exemple de 10 à 1000 µg par  
20 voie parentérale, une fois par semaine pendant deux mois, puis périodiquement en fonction du niveau de la réponse cellulaire ou humorale induite, par exemple tous les deux à six mois.

Selon un premier aspect, la composition vaccinale selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible  
25 d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps neutralisant l'activité immunosuppressive de la protéine E7 sauvage.

Selon un premier mode de réalisation particulier, ladite composition vaccinale est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant  
30 susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d' isotype IgA.

Selon un second mode de réalisation préféré, ladite composition vaccinale est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la  
35 production d'anticorps d'isotype IgG.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré, une composition vaccinale selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend la combinaison (i) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgA et (ii) d'un  
5 adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgG.

De préférence, la composition vaccinale selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant de l'immunité susceptible d'induire une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire.

10 De préférence, on cherchera à obtenir l'induction d'une réponse cellulaire, caractérisée notamment par la prolifération de lymphocytes T exprimant l'antigène CD8 et reconnaissant spécifiquement la protéine E7 sauvage, telle que présentée à la surface des cellules cancéreuses en association avec les antigènes de classe I du MHC.

15 Selon un autre mode de réalisation particulier d'une composition vaccinale selon l'invention, cette composition vaccinale peut comprendre un ou plusieurs autres composés antigéniques ou immunogènes de HPV. Par exemple, dans une composition vaccinale selon l'invention, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée peut être associé à une  
20 ou plusieurs protéines de capsid de HPV-16, ou à des peptides obtenus à partir de ces protéines de capsid, en particulier les protéines L1 et L2 de HPV-16 bien connues de l'homme du métier.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier, la composition vaccinale selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs composés  
25 antigéniques ou immunogènes capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire ou humorale à l'encontre de types de HPV distincts de HPV-16, préférentiellement de type de HPV connus pour provoquer des cancers, tels que HPV-18, 31, 33 et 51.

Dans encore un autre mode de réalisation particulier d'une préparation  
30 vaccinale selon l'invention, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée peut être combiné avec un ou plusieurs composés antigéniques ou immunogènes capables d'induire la production d'anticorps à l'encontre de facteurs solubles à propriétés immunosuppressives ou angiogéniques tels que l'IFN $\alpha$ , le TGF $\beta$ , le TNF $\alpha$  ou encore le VEGF. De  
35 préférence, ces composés antigéniques ou immunogènes sont

respectivement l'IFN $\alpha$ , le TGF $\beta$ , le TNF $\alpha$  ou le VEGF modifiés chimiquement de manière à détruire leurs propriétés immunosuppressives et/ou à les stabiliser. De telles modifications chimiques, par exemple par carboxyméthylation, sont bien connues de l'homme du métier. Elles sont  
5 notamment décrites par Frankel et al. (1988).

Selon un aspect préféré de ce mode de réalisation particulier d'une composition vaccinale selon l'invention, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée et au moins un autre composé antigénique ou immunogène sont liés chimiquement pour former un composé super  
10 immunogène tel que décrit dans la demande de brevet français n°01 10.751 déposée le 10 Août 2001 au nom de la Société NEOVACS.

### ***Superimmunogènes composites***

15 Un tel superimmunogène composite comprend deux polypeptides immunogènes distincts physiquement liés l'un à l'autre, les deux polypeptides consistant respectivement en :

(a) un premier polypeptide immunogène induisant une réaction immunitaire cellulaire, ou une réaction immunitaire cellulaire et humorale,  
20 à l'encontre d'une structure antigénique pathogène cellulaire de HPV16 ;

(b) un second polypeptide immunogène induisant la production d'anticorps neutralisants ou bloquants à l'encontre d'une protéine circulante locale du stroma choisie parmi un facteur cytokinique ou un facteur de régulation cellulaire à propriétés immunotoxiques ou  
25 angiogéniques, ce facteur étant produit par les cellules cancéreuses ou les cellules stromales, y compris les lymphocytes T et les cellules présentant l'antigène (APC).

Le superimmunogène composite utilisé selon l'invention est dit « bifonctionnel » car les deux polypeptides (a) et (b), qui sont les deux  
30 parties essentielles qui le constituent, permettent l'induction simultanée d'une réaction immunitaire dirigée contre deux cibles distinctes, respectivement la structure antigénique pathogène et la protéine circulante locale du stroma. Toutefois, un superimmunogène composite bifonctionnel selon l'invention peut comprendre dans sa structure une pluralité de copies respectivement  
35 d'un polypeptide (a) et/ou d'un polypeptide (b).

Le polypeptide (a) et le polypeptide (b) constitutifs d'un composé superimmunogène composite de l'invention sont dits « physiquement liés » l'un à l'autre car ils sont dans tous les cas inclus tous les deux dans une même structure physique, molécule ou particule (microparticule ou nanoparticule), au sein de laquelle ils sont peu distants l'un de l'autre. Du fait qu'ils sont physiquement liés l'un à l'autre dans le superimmunogène composite, le polypeptide (a) et le polypeptide (b) sont présentés conjointement aux mêmes cellules immunocompétentes, aussi bien les macrophages que les lymphocytes T ou B.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'un superimmunogène composite, les polypeptides (a) et (b) sont choisis respectivement parmi :

- **Polypeptide (a)** : les protéines L1 et L2 du papillomavirus HPV-16, détoxiquée ou stabilisée si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée (Le Buanec et al., 1999) ;
- **Polypeptide (b)** : une protéine E7 mutée selon l'invention, par exemple une protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1.

Selon un second mode de réalisation préféré d'un superimmunogène composite, les polypeptides (a) et (b) sont choisis respectivement parmi :

- **Polypeptide (a)** : une protéine E7 mutée selon l'invention, par exemple la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1,
- **Polypeptide (b)** : les protéines IFN $\alpha$ , TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  et VEGF, détoxiquées ou stabilisées si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou une protéine immunogène qui en est dérivée.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne aussi une composition comprenant plusieurs superimmunogènes composites se distinguant par l'identité de la protéine E7 mutée (polypeptide (a) ou polypeptide (b), selon le type de superimmunogène composite).

Pour fabriquer un superimmunogène composite selon l'invention, on réalise un couplage du polypeptide (a) et du polypeptide (b) par voie chimique ou par recombinaison génétique.

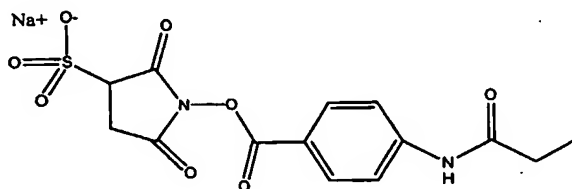
Dans un mode de réalisation particulier du conjugué peptidique immunogène de l'invention, les polypeptides (a) et (b) sont liés directement entre eux de manière covalente, par exemple via une liaison peptidique-CO-NH-.

Cependant, afin d'introduire une certaine flexibilité dans la structure du conjugué peptidique immunogène, et notamment de permettre une mobilité dans l'espace des polypeptides (a) et (b), l'un par rapport à l'autre au sein du conjugué peptidique immunogène, on préfère un conjugué peptidique dans lequel les polypeptides (a) et (b) sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué, par une chaîne espaceur.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'un conjugué peptidique immunogène, les polypeptides (a) et (b) sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué, par une chaîne espaceur choisie parmi le SMCC ou le SIAB, qui sont tous les deux des composés bifonctionnels.

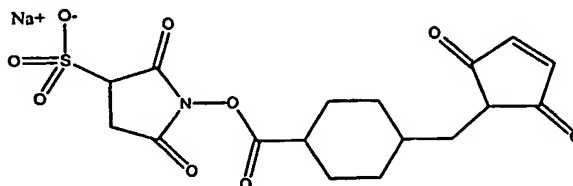
Le composé SIAB, décrit par Hermanson G.T. (1996, Bioconjugate techniques, San Diego : Academic Press, pp 239-242), est le composé de formule (I) suivante :

(I)



Le composé SIAB comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe iodoacétate et un groupe ester Sulfo-NHS, ces groupes réagissant respectivement sur des groupes amino et sulfhydryl.

Le composé SMCC, qui est décrit par Samoszuk M.K. et al. (1989, Antibody, Immunoconjugates Radiopharm., 2(1) : 37-46), est le composé de formule (II) suivante :



(II)

Le composé SMCC comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe ester Sulfo-NHS et un groupe maléimide, qui réagissent respectivement avec un groupe amino et un groupe sulfhydryl.

5        Selon un second mode de réalisation préféré, le superimmunogène composite comprend une chaîne espaceur constituée d'un peptide espaceur linéaire. On choisira de préférence un peptide espaceur linéaire ayant de 3 à 30 acides aminés de longueur, avantageusement de 5 à 20 acides aminés de longueur et de manière tout à fait préférée de 7 à 15 acides aminés de  
10       longueur.

Préférentiellement, le peptide espaceur linéaire est essentiellement, voire exclusivement, constitué d'acides aminés chargés positivement ou négativement à pH 7,0 afin d'accroître l'hydrophilicité globale dudit superimmunogène composite. On comprend que l'on devra éviter d'utiliser  
15       des peptides espaceurs constitués d'acides aminés hydrophobes. De manière préférentielle, le peptide espaceur est caractérisé en ce qu'il est constitué d'une chaîne de poly-(lysine) constituée de 3 à 30 résidus lysine, avantageusement de 5 à 20, et de manière tout à fait préférée de 7 à 15 résidus lysine de longueur.

20       Selon encore un autre mode de réalisation d'un superimmunogène composite selon l'invention, les polypeptides (a) et (b) sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué peptidique, par une chaîne espaceur constituée d'un peptide espaceur ramifié, de préférence une structure oligodendrimérique de poly(lysine), telle que décrite par exemple par Basak  
25       et al. (1995).

Dans ce dernier mode de réalisation d'un superimmunogène composite selon l'invention, ledit conjugué peptidique peut comprendre plusieurs copies des polypeptides (a) et (b) par molécule de conjugué, avantageusement de 2 à 8 copies des polypeptides (a) et (b), de préférence  
30       au plus 4 copies de chacun des polypeptides (a) et (b) par molécule de conjugué.

Les polypeptides (a) et (b) peuvent aussi être inclus tous les deux au sein d'une même structure physique par exemple sur des nanoparticules ayant un diamètre compris entre 10 et 500 nanomètres, de préférence entre  
35       10 et 2000 nanomètres, et de manière tout à fait préférée entre 10 et 100

nanomètres, par exemple des nanoparticules d'IMS, comme décrit par exemple par Aucouturier et al. (2001), de chitosan, comme décrit par exemple par Skaugrud et al. (1999), de liposomes, ou de particules biodégradables comme le polylactide acide (PLA), le poly-ε-caprolactone (PLC) ou le poly(lactide-coglycolide) (PLG) décrit par Baras et al. (1999).

Selon encore un autre mode de réalisation, les polypeptides (a) et (b) sont liés physiquement au sein d'une même structure porteuse permettant leur présentation simultanée aux cellules du système immunitaire. Dans ce mode de réalisation particulier, les polypeptides (a) et (b) sont immobilisés sur des nanoparticules, par exemple des nanoparticules de chitosan, de IMS (Immunomodulateur accessible auprès de la Société Seppic, France), constitué de nanoparticules lipidiques d'un diamètre de 100 à 300 nanomètres) ou de liposomes.

Préférentiellement, de telles nanoparticules sont de faible taille de manière à présenter simultanément les polypeptides (a) et (b) aux cellules, de la même manière que si ces polypeptides étaient liés de manière covalente au sein de la même molécule. Avantageusement les nanoparticules ont un diamètre compris entre 10 et 1000 nm, mieux entre 10 et 500 nm, préférentiellement entre 10 et 300 nm et de manière tout à fait préférée entre 10 et 200 nm.

#### **Compositions vaccinales contenant un acide nucléique codant la protéine E7 mutée selon l'invention.**

L'invention a aussi pour objet une composition immunogène, ou une composition vaccinale dépourvue de propriété immunosuppressive, préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection à papillomavirus, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité immunologiquement efficace d'un acide nucléique codant une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, d'une cassette d'expression ou encore d'un vecteur recombinant tel que défini dans la présente description.

Pour la mise en œuvre de la composition vaccinale ci-dessus, on préfère, en tant que vecteur d'expression, un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par



exemple décrits par Flotte et al. (1992), Samulski et al. (1989), ou encore McLaughlin et al. (1996). Pour introduire les acides nucléiques, les cassettes d'expression ou les vecteurs dans une cellule hôte, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à différentes techniques, comme la technique de précipitation au phosphate de calcium (Graham et al.), 1973, Chen et al. 1987), le DEAE dextran (Gopal, 1985), l'électroporation (Turkaspas, 1986, Potter et al. 1984), la micro-injection directe (Harland et al., 1985) ou encore les liposomes chargés en ADN (Nicolau et al., 1987 ; Fraley et al., 1980).

Selon un mode de réalisation particulier, une méthode pour introduire un acide nucléique ou une cassette d'expression selon l'invention dans une cellule hôte, en particulier une cellule hôte provenant d'un mammifère, *in vivo*, comprend une étape au cours de laquelle on introduit une préparation comprenant l'acide nucléique ou la cassette d'expression dans un véhicule pharmaceutiquement compatible, par injection locale au niveau du tissu choisi, par exemple un tissu musculaire lisse ou encore un tissu muqueux, l'acide nucléique ou la cassette d'expression étant absorbé par les cellules de ce tissu.

Des compositions pour l'utilisation *in vitro* et *in vivo* comprenant des acides nucléiques ou des cassettes d'expression « nus » sont par exemple décrites dans la demande PCT N°WO 95/11.307 ainsi que dans les articles de Tacson et al. (1996) et de Huygen et al. (1996).

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

La quantité de vecteur qui est injectée à l'organisme hôte choisi varie selon le site de l'injection. A titre indicatif, il peut être injecté entre environ 10 µg et 1000 µg de l'acide nucléique ou de la cassette d'expression codant la protéine E7 mutée selon l'invention dans le corps d'un patient.

### **Compositions destinées à la vaccination passive antitumorale.**

Comme cela apparaît clairement dans la présente description, la production d'anticorps systémiques ou mucosaux est essentielle afin de bloquer les propriétés immunosuppressives de la protéine E7 sécrétée par les cellules cancéreuses infectées par HPV-16.

Dans la situation dans laquelle une composition vaccinale comprenant une protéine E7 mutée selon l'invention, ou la composition vaccinale comprenant un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant codant la protéine E7 mutée, est utilisée à titre thérapeutique ,  
5 c'est-à-dire après l'événement d'infection par HPV-16, il est avantageux de bloquer rapidement l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 produite et sécrétée par les cellules cancéreuses afin de favoriser l'induction rapide d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire par ladite composition vaccinale, dans le but d'augmenter encore l'efficacité de celle-ci.

10 Le blocage précoce de l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 produite par les cellules infectées peut être réalisé en administrant aux patients une quantité efficace d'anticorps neutralisants obtenus après immunisation de l'homme ou de l'animal à l'encontre de la protéine E7 native, en utilisant une protéine E7 mutée de l'invention en tant que composé  
15 antigénique ou immunogène, en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriée.

L'invention concerne aussi un procédé de préparation d'anticorps neutralisant l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 native de HPV-16, caractérisé en ce qu'il comporte une étape dans laquelle on immunise un  
20 mammifère, y compris l'homme, à l'aide d'une protéine E7 mutée de l'invention, puis on récupère les anticorps produits.

L'invention est aussi relative à des anticorps dirigés contre une protéine E7 mutée selon l'invention. Ces anticorps sont notamment caractérisés en ce qu'ils sont neutralisants, c'est-à-dire qu'ils neutralisent  
25 l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 native.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant des anticorps neutralisant l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 native de HPV 16, en particulier la protéine E7 sécrétée par des cellules infectées par HPV-16, lesdits anticorps étant dirigés contre une protéine E7  
30 mutée selon l'invention.

Elle est aussi relative à une composition pour vaccination passive à l'encontre d'une infection par HPV-16, y compris à l'encontre d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16, contenant les anticorps définis ci-dessus.

Pour vérifier la capacité neutralisante des anticorps selon l'invention, l'homme du métier se réfère avantageusement au test décrit à l'exemple 1, consistant à quantifier le pourcentage d'inhibition de la production d'IFN- $\alpha$  ou de TNF- $\alpha$  par des macrophages humains exposés à la protéine E7 native.

5 L'invention a encore pour objet une méthode pour bloquer l'effet immunosuppresseur de la protéine E7 produite par des cellules infectées par le virus HPV-16, caractérisée en ce que l'on administre aux patients une quantité neutralisante d'anticorps obtenus après immunisation de l'homme ou de l'animale avec une protéine E7 mutée telle que définie dans la  
10 présente description.

La « quantité neutralisante » d'anticorps à administrer au patient varie selon l'étendue de l'infection par HPV. En général, on administre au patient une quantité d'anticorps neutralisants qui correspond à la quantité d'anticorps neutralisants nécessaire à bloquer l'activité immunosuppressive  
15 d'une quantité de protéine E7 native allant de 100 ng à 1 mg, dans le test d'immunosuppression décrit à l'exemple 1..

Les anticorps peuvent être des anticorps d'isotype IgA ou d'isotype IgG. Ils peuvent être des anticorps polyclonaux ou encore des anticorps monoclonaux.

20 Les anticorps selon l'invention englobent également les fragments F(ab')<sub>2</sub> ou F(ab).

**Composition vaccinale comprenant des cellules dendritiques traitées avec une protéine E7 mutée selon l'invention.**

25

Les cellules dendritiques sont des cellules présentant l'antigène (APC) qui sont spécialisées dans l'initiation de l'immunité cellulaire T. Un contact physique entre des cellules dendritiques et des cellules T est requis pour l'induction d'une réponse immunitaire des cellules T. Les cellules  
30 dendritiques activent les réponses immunitaires spécifiques d'un antigène donné, via deux étapes de signalisation. La première étape de signalisation implique une interaction peptide antigénique-MHC/ récepteur des cellules T (TCR). La seconde étape de signalisation implique des molécules co-stimulatrices, tels que les marqueurs de surface cellulaires et les cytokines.

Les cellules dendritiques produisent diverses cytokines lorsqu'elles présentent l'antigène aux cellules T, ce qui influence le micro-environnement de cytokines, puis la réponse immunitaire subséquente.

Plus spécifiquement, on sait que la vaccination avec des cellules  
5 dendritiques permet de casser la tolérance immunologique du système immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales et induit la lyse de la tumeur dans l'organisme hôte par la stimulation d'une réponse immunitaire cellulaire T de type Th1, tout au moins dans les cancers pour lesquels il n'existe pas de situation d'immunosuppression concomitante avec le développement de  
10 la tumeur.

On a montré selon l'invention que l'incubation *in vitro* d'une population de cellules dendritiques d'un individu avec une quantité appropriée d'une protéine E7 mutée, telle que définie dans la présente description, rendaient ces cellules dendritiques aptes à présenter subséquentement ladite protéine  
15 E7 mutée aux cellules T présentes dans une population de cellules mononucléées autologues, obtenues à partir du même individu, et à induire l'activation des cellules T spécifiques de la protéine E7, qui est visualisée par la prolifération de ces cellules T. L'activation des cellules T, peut être mesurée, par exemple, par la quantité d'incorporation intracellulaire de [<sup>3</sup>H]  
20 thymidine, comme cela est illustré à l'exemple .

Dans une expérience similaire, mais dans laquelle les cellules dendritiques sont préalablement incubées *in vitro* avec la protéine E7 native, on n'observe aucune activation des cellules T, comme dans la population de cellules dendritiques témoin incubée en l'absence de tout antigène exogène.  
25 Dans ce système, on observe, une fois encore, l'activité immunosuppressive de la protéine E7 native.

Au contraire, une protéine E7 mutée selon l'invention est dépourvue d'activité immunosuppressive et permet l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire T spécifique efficace, à l'encontre de la protéine E7  
30 native.

L'invention a encore pour objet une composition vaccinale dépourvue de propriété immunosuppressive, préventive ou curative à l'égard d'un cancer provoqué par une infection à *Papillomavirus*, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, une quantité appropriée de cellules  
35 dendritiques autologues ou allogéniques vis-à-vis de l'individu à traiter,

lesdites cellules dendritiques autologues ayant été incubées avec une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description et ainsi rendues aptes à présenter ladite protéine E7 mutée aux cellules T la reconnaissant spécifiquement.

- 5 L'invention a aussi pour objet une méthode pour prévenir ou guérir un cancer provoqué par une infection à *Papillomavirus*, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape dans laquelle on administre à l'individu à traiter une quantité appropriée de cellules dendritiques autologues (isogéniques) ou allogéniques vis-à-vis de l'individu à traiter, lesdites cellules dendritiques  
10 autologues( isogéniques) ou allogéniques ayant été incubées, préalablement à leur administration à l'individu, avec une protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description et ainsi rendues aptes à présenter ladite protéine E7 mutée aux cellules T la reconnaissant spécifiquement.

- De préférence, les cellules dendritiques sont obtenues par  
15 différenciation de monocytes préparés par élutration à partir de sang périphérique humain, soit du sang du patient, soit du sang d'un individu partageant avec le patient un haplotype du complexe majeur d'histocompatibilité, tel qu'un haplotype du HLA-A2.

- De préférence, les cellules dendritiques, une fois prélevées à partir du  
20 patient, sont mise en culture dans un milieu de culture approprié pour la culture de cellules de mammifère, tels que le milieu HL1 (Bio Whittaker), le cas échéant additionné de glutamine, et éventuellement également d'un ou plusieurs antibiotiques, telle que la streptomycine et la culture est réalisée à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide et à 5% (V/V) de CO<sub>2</sub>..

- 25 Les cellules dendritiques en culture sont ensuite incubées avec une quantité choisie de la protéine E7 mutée, de préférence une quantité allant de 5 à 50 µg/ml.

- Préférentiellement, on incube les cellules dendritiques avec la protéine E7 mutée, à raison d'une quantité de protéine E7 mutée par 10<sup>6</sup> cellules  
30 dendritiques allant de 1 à 50 µg.

Préférentiellement, on administre au patient à traiter une quantité de cellules dendritiques traitées avec une protéine E7 mutée selon l'invention allant de 10<sup>1</sup> à 500 x 10<sup>6</sup> cellules.

- Avantageusement, on réalise une seule administration au patient, par  
35 injection par la voie parentérale, des cellules dendritiques traitées par la

protéine E7 mutée. On peut aussi réaliser, si nécessaire, de multiples injections au patient, en fonction de l'intensité de la réponse immunitaire anti-E7 qui est provoquée, par exemple une administration mensuelle, bimestrielle, trimestrielle ou bi-annuelle, des cellules dendritiques traitées

5 L'invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

**Figure 1**, un graphe des titres d'anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

10 **Figure 2**, un graphe du pourcentage de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

**Figure 3**, un graphe de l'index de prolifération Ip de splénocytes de souris naïves et de souris immunisées avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26, cultivées en présence de la protéine E7 native ;

15 **Figure 4**, un graphe du taux d'IFN- $\gamma$  de splénocytes de souris naïves et de souris immunisées avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26, cultivées en présence de la protéine E7 native ;

**Figures 5 à 8**, des graphes du titre d'IgG anti-E7 sérique de souris et des pourcentages de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

**Figures 9 et 10**, des graphes du titre d'IgG anti-E7 sérique de souris et des pourcentages de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sériques de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

25 **Figure 11**, un graphe représentant le taux d'IgA présent dans les sécrétions vaginales de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

**Figures 12 et 13**, des graphes du titre d'IgG anti-E7 sérique de souris et des pourcentages de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

30 **Figure 14**, un graphe représentant le taux d'IgA présent dans les sécrétions vaginales de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 ;

**Figure 15** un graphe de la croissance tumorale de cellules C3 injectées à des souris immunisées ou non avec une préparation E7 $\Delta$ 21-26 .

**Figure 16** graphes représentant le développement des tumeurs C3 chez des souris ayant reçu  $7 \times 10^3$  cellules C3 exprimant E7 de HPV16. **Figure 16A** : souris témoins ; **Figure 16B** : souris traitées avec E7 $\Delta$ 21626. En abscisse, le nombre de jours après l'injection des cellules C3. En ordonnées, la surface des tumeurs.

**Figure 17** : graphes représentant le développement des tumeurs C3 chez des souris ayant reçu «  $9 \times 10^3$  » cellules C3 exprimant E7 de HPV16.

**Figure 18** : graphe représentant le niveau de réaction lymphocytaire mixte, mesurée par le niveau de prolifération des cellules mononucléées effectrices stimulées par les cellules dendritiques témoin (losange vide), prétraitées avec la protéine E7 native (cercle plein) ou prétraitées avec la protéine E7 $\Delta$ 21-26 (carré hachuré). En ordonnées prolifération des cellules mononucléées effectrices, visualisée par incorporation de [3H] thymidine. En abscisse, le rapport entre le nombre de cellules stimulantes (cellules dendritiques) et le nombre de cellules effectrices (cellules T).

### **EXEMPLE 1 : Réponse immune (humorale et cellulaire) systémique.**

#### **Exemple 1.1: Activité immunogène de la protéine E7 $\Delta$ 21-26 en présence d'adjuvant complet (ACF) et incomplet (AIF) de FREUND**

L'activité immunogénique (humorale et cellulaire) de la préparation E7  $\Delta$ 21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence de ACF et d'AIF.

##### ***A. Matériel et méthodes***

Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml (50  $\mu$ g) d'une émulsion en ACF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5  $\mu$ g en AIF est donnée à J21 et J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 8 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

- 3 souris reçoivent 100  $\mu$ g de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

Les souris sont challengées avec des cellules C3, 12 jours après la dernière immunisation. Les cellules C3, sont des cellules embryonnaires d'origine C57BL/6, transformées avec le génome HPV16 entier et l'oncogène *ras* ( Feltkamp, M.C., H.L. Smits, M.P. Vierboom, R.P. Minnaar, B.M. de Jongh, J.W. Drijfhout, J. ter Schegget, C.J. Melief, and W.M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16- transformed cells. Eur.J.Immunol. 23:2242-2249.). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Bio-Whittaker) additionné de 10% de FCS, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 250 ng/ml de fungizone à 37°C dans une atmosphère humide contenant 7% de CO<sub>2</sub>. Les cellules destinées à être injectées aux souris sont lavées dans du milieu sans sérum après avoir été détachées du plastique à l'aide de trypsine.

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

#### **B. Résultats :**

Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26, en présence de ACF et d'AIF, ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

##### **1. Réponse humorale**

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

**Figure 1 :**



Les souris immunisées avec la préparation de E7  $\Delta$ 21-26, en présence de ACF et d'AIF, présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 sont incubées pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN- $\gamma$  pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF- $\alpha$  produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérums neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF- $\alpha$ , alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

## Figure 2

Les anticorps induits par la préparation E7  $\Delta$ 21-26 en présence d'ACF puis d'AIF ont un pouvoir neutralisant très important.

## 2. Réponse cellulaire

### 2.1. Prolifération cellulaire

Les cellules spléniques des souris immunisées et des souris contrôles sont isolées puis cultivées dans des puits à fond rond d'une plaque de micro-culture à raison de 100 000 cellules/puits en présence de E7 natif. La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 6 jours. 18 heures avant la fin de l'incubation, 0.5  $\mu$ Ci de thymidine tritiée/ puits sont ajoutés. L'intensité de la réponse immunitaire est proportionnelle à l'index de prolifération Ip.

Ip = cpm (coups par minute) pour l'antigène donné / cpm contrôle

## Figure 3

Les cellules spléniques des souris immunisées avec la préparation E7  $\Delta$ 21-26, en présence de ACF et d'AIF, prolifèrent, lorsqu'elles sont activées, in vitro, avec la protéine E7 native.

## 5           2.2. Production d'IFN- $\gamma$

La présence d'IFN gamma dans les surnageants de culture des cellules spléniques cultivées en présence de 10  $\mu$ g/ml de E7 natif est déterminée, après 72 heures de culture, à l'aide d'un test ELISA (LO-IMEX, Belgium) comme décrit précédemment (De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, 10 L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. J.Exp.Med. 184:1413-1424.) Les résultats sont exprimés en UI/ml.

15

### Figure 4

Les cellules spléniques des souris immunisées avec la préparation E7  $\Delta$ 21-26 en présence d'ACF puis d'AIF produisent une quantité importante d'IFN gamma lorsqu'elles sont activées, in vitro, avec la protéine E7 native.

20

#### **Exemple 1.2. : Activité immunogène de la protéine E7 $\Delta$ 21-26 en présence d'adjuvant incomplet de FREUND (AIF)**

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7  $\Delta$ 21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) femelles, âgées de 6 semaines, 25 achetées chez Charles River, en présence d'AIF.

#### **A. Matériel et méthodes**

Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml (50  $\mu$ g) d'une émulsion en AIF en présence de 1 $\mu$ g de GM-CSF murin et 1,5  $\mu$ g d'IL- 30 2 murin par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5  $\mu$ g en AIF est donnée à J21 et J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.
- 5 - 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique  
10 après autopsie.

### **B. Résultats :**

Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26 en présence d'AIF ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

15 Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

#### **1. Réponse humorale**

20

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

25

#### **Figure 5**

Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence d'AIF présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

30 L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN-γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF-α produite est mesurée par un  
35 test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérums neutralisants empêchent

la protéine E7 d'induire l'expression de TNF- $\alpha$ , alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

5

### Figure 6

Les anticorps induits par la préparation E7  $\Delta$ 21-26 en présence d'AIF ont un pouvoir neutralisant très important.

10 **Exemple 1.3 : Activité immunogène de la protéine E7  $\Delta$ 21-26 enchassée dans des nanoparticules de chitosan en présence d'adjuvant incomplet de FREUND (AIF)**

15 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans des nanoparticules de chitosan a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence d'AIF.

#### **A. Matériel et méthodes**

20 Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml (50  $\mu$ g) d'une émulsion en AIF en présence de 1 $\mu$ g de GMC-SF murin et 1,5  $\mu$ g d'IL-2 murin par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5  $\mu$ g en AIF est donnée à J21 et J60.

25 Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

- 3 souris reçoivent 100  $\mu$ g de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

30 L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

**B. Résultats :**

Les souris immunisées par la préparation E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans des nanoparticules de chitosan en présence d'AIF ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100  $\mu$ g de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

**1. Réponse humorale**

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

**Figure 7**

Les souris immunisées avec la préparation de E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans des nanoparticules de chitosan en présence d'AIF présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN- $\gamma$  pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF- $\alpha$  produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérums neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF- $\alpha$ , alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

**Figure 8**

Les anticorps induits par la préparation E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans des nanoparticules de chitosan en présence d'AIF ont un pouvoir neutralisant très important.

**EXEMPLE 2 : Réponse immunitaire systémique et mucosale****Exemple 2.1 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 (SEPPIC)**

5

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7 Δ21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence d'IMS 1113. (SEPPIC)

10 **A. Matériel et méthodes**

Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml contenant 50 µg de E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 avec 1µg de GM-CSF murin et 1,5 µg d'IL-2 murin par voie intramusculaire, ainsi que 20 µl contenant 20 µg de cette même préparation par voie intranasale.

15 

Au jour 7, 14 et 21, ces souris reçoivent par voie intranasale 20 µl soit 20 µg de la préparation en IMS 1113.

Au jour 60, ces souris reçoivent une injection de 0.2 ml contenant 5 µg de la préparation en IMS 1113 et 20 µl contenant 20 µg de cette même préparation par voie intranasale.

20 

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital ainsi qu'un prélèvement des sécrétions vaginales est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

25 

- 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

30

**B. Résultats :**

Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

35

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

5

## **1. Réponse humorale**

### **1.1. Production d'anticorps d'isotype G dans les sérums**

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

10

### **Figure 9**

Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

15

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN-γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF-α produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérums neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF-α, alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

20

25

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

### **Figure 10**

30

### **1.2. Production d'anticorps d'isotype A dans les sécrétions vaginales**

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgA dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

35

**Figure 11**

Les souris immunisées avec la préparation de E7  $\Delta$ 21-26 en présence  
5 d'IMS 1113 présentent des titres d'anticorps de type IgA anti-E7 très importants.

**Exemple 2.2 : Activité immunogène de la protéine E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans du chitosan en présence d'AIF (voie systémique) ou en présence de PBS (voie nasale)**  
10

L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans du chitosan, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River.

**A. Matériel et méthodes**  
15

Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml contenant 50  $\mu$ g de E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans du chitosan en présence d'AIF avec 1 $\mu$ g de GM-CSF murin et 1,5  $\mu$ g d'IL-2 murin par voie  
20 intramusculaire, ainsi que 20  $\mu$ l contenant 20  $\mu$ g de cette même préparation en présence de PBS additionnée d'1 $\mu$ g de GM-CSF murin et 1,5  $\mu$ g d'IL-2 murin par voie intranasale.

Au jour 7, 14 et 21, ces souris reçoivent par voie intranasale 20  $\mu$ l soit 20  $\mu$ g de E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans du chitosan en présence de PBS.

25 Au jour 60, ces souris reçoivent une injection de 0.2 ml contenant 5  $\mu$ g de la préparation en AIF et 20  $\mu$ l contenant 20  $\mu$ g de cette même préparation en présence de PBS par voie intranasale.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital ainsi qu'un prélèvement des sécrétions vaginales est effectué sur chaque souris avant la  
30 première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.

- 3 souris reçoivent 100  $\mu$ g de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de  
35 signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.



**B. Résultats :**

Les souris immunisées par la préparation E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans du chitosan ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100  $\mu$ g de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

**1. Réponse humorale****1.1. Production d'anticorps d'isotype G dans les sérums**

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

**Figure 12**

Les souris immunisées avec la préparation de E7  $\Delta$ 21-26 enchâssée dans du chitosan présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN- $\gamma$  pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF- $\alpha$  produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérums neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF- $\alpha$ , alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

**Figure 13**

## 1.2. Production d'anticorps d'isotype A dans les sécrétions vaginales

5 La présence dans le sérum d'anticorps de type IgA dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

### Figure 14

10 Les souris immunisées avec la préparation de E7  $\Delta$ 21-26, enchâssée dans du chitosan, présentent des titres d'anticorps de type IgA anti-E7 très importants.

### 15 **EXEMPLE 3 : Réponse anti-tumorale protectrice**

#### **Exemple 3.1 : L'injection des protéines E7 $\Delta$ 21-26 en présence d'ACF puis AIF génère une résistance anti-tumorale.**

20 La mesure d'une réponse anti-tumorale protectrice chez les souris immunisées avec la préparation de E7  $\Delta$ 21-26 en présence d'ACF puis d'AIF (exemple 1.1) a été testée de la manière suivante.

12 jours après la dernière immunisation, les souris ont été injectées avec 500.000 cellules C3, en sous-cutané (s-c) dans le flanc. Les cellules C3, sont des cellules embryonnaires d'origine C57BL/6, transformées avec le  
25 génome HPV16 entier et l'oncogène *ras*. La croissance tumorale est évaluée 1 fois par semaine par la mesure de la surface de la tumeur.

### Figure 15

30 Une tumeur s'est développée chez toutes les souris contrôles traitées uniquement avec l'adjuvant. Parmi les 6 souris immunisées avec la préparation E7  $\Delta$ 21-26 en présence d'ACF puis d'AIF :

- 4 souris n'ont développé aucune tumeur
- chez 1 souris, une tumeur s'est développée puis stabilisée

- chez 1 souris, une tumeur s'est développée

La protéine E7  $\Delta$ 21-26, génère chez la souris, en présence de ACF et d'AIF, une réponse immune spécifique protectrice contre une tumeur induite par le papillomavirus humain de type 16.

5

#### **EXEMPLE 4 : Réponse anti-tumorale thérapeutique**

La capacité de la préparation E7 $\Delta$ 21-26 en présence d'AIF à induire le rejet de tumeurs C3 préimplantées a été testée chez des souris C57 BL/6(H-2b) de la manière décrite ci-dessous.

10

#### **Exemple 4.1 : Mise en place du modèle thérapeutique**

##### **A. Matériel et méthodes**

15

Des souris (groupes de 8) ont été injectées en s.c. dans le flanc avec un nombre croissant de cellules C3 : 0 ;  $5 \cdot 10^2$  ;  $5 \cdot 10^3$  ;  $5 \cdot 10^4$  et  $5 \cdot 10^5$ . La croissance tumorale est évaluée 1 fois par semaine par la mesure de la surface de la tumeur.

20

##### **Résultats**

**TABLEAU I**

**Evaluation de la croissance tumorale par la mesure de la surface\* des tumeurs**

| Nombre de cellules injectées | JO | J12 | J17 | J24        | J31        |
|------------------------------|----|-----|-----|------------|------------|
| Oe + 0                       | 0  | 0   | 0   | 0          | 0          |
| 5e + 2                       | 0  | 0   | 0   | 0,1        | 1,9        |
| 5e + 3                       | 0  | 0   | 0   | 0          | 2,8        |
| 5e + 4                       | 0  | 0   | 0   | 10         | 6,9        |
| 5e + 5                       | 0  | 25  | 202 | sacrifiées | sacrifiées |

**\* La surface, exprimée en mm<sup>2</sup>, représente la moyenne obtenue à partir de la mesure de surface de 8 tumeurs.**

5 Les souris ayant reçu  $5 \cdot 10^5$  cellules ont toutes développé une tumeur 12 jours après l'injection de cellules (8/8).

Parmi les souris ayant reçu  $5 \cdot 10^4$  cellules, 4 souris/8 ont développé une tumeur 21 jours après l'injection des cellules et 4 souris /8, 28 jours après l'injection.

10 Parmi les souris ayant reçu  $5 \cdot 10^3$  cellules, 1 souris /8 a développé une tumeur 35 jours après l'injection des cellules, 3 souris /8, 42 à 60 jours après l'injection et les 4 autres souris ne présentent toujours pas de tumeur.

15 Parmi les souris ayant reçu  $5 \cdot 10^2$  cellules, 1 souris /8 a développé une tumeur 35 jours après l'injection des cellules, les 7 autres souris n'ont toujours pas développé de tumeur.

**Exemple 4.2 : Réponse anti-tumorale chez la souris ayant reçu une dose de  $7 \cdot 10^3$  et  $9 \cdot 10^3$  cellules C3 exprimant la protéine E7**

20

**A. Matériel et méthodes**

Des souris ont d'abord été injectées en s.c. dans le flanc avec 7000 ou 9000 cellules C3 (jour 0). Le jour 2, 9, 16 et 23, les souris ont reçu une injection en intramusculaire de 10 µg de la préparation E7Δ21-26 dans de l'AIF et 1 µg de GM-CSF et d'IL2 murin. Les jours 9, 16, 23 et 60, les souris ont reçu une injection en intramusculaire de 10 µg de la préparation E7Δ21-26 dans de l'AIF.

La taille des tumeurs a été mesurée 2 fois par semaine comme décrit plus haut dans l'exemple 4.1.

## B. Résultats

Les figures 16 et 17 présentent les résultats obtenus.

Les souris contrôles développent toutes des tumeurs (8/8) 10 à 20 jours après l'injection des cellules C3 alors que 80 % (7 000 cellules injectées - Figure 16) et 75 % (9 000 cellules injectées - Figure 17) des souris immunisées n'en développent pas.

### Exemple 5 : Stimulation d'une réaction mixte lymphocytaire avec des cellules dendritiques prétraitées avec la protéine E7 mutée E7 $\Delta$ 21-26

Une réaction lymphocytaire mixte autologue unidirectionnelle consiste à co-cultiver des cellules mononucléées d'un individu (cellules effectrices ou répondeuses) avec ses cellules dendritiques (cellules stimulantes) porteuses d'antigènes (TSA). Les cellules effectrices, possédant des récepteurs spécifiques pour l'antigène porté par les cellules stimulantes, prolifèrent. La prolifération est mesurée par le test d'incorporation à la thymidine tritiée.

Les cellules dendritiques proviennent de la différenciation de monocytes obtenus par élutriation à partir des PBMCs du sang périphérique d'un donneur (Sallusto et al, Journal of Experimental Medicine, 1994, 179, 1109-18). Des monocytes, à  $2,5 \cdot 10^6$  cellules/ml sont cultivés dans des poches de téflon dans du RPMI 1640 enrichi en SAB (10 %), en GMC-SF (50 ng/ml) et en IL4 (1 000 Unité /ml). Après 6 jours de culture, ces cellules présentent le phénotype de cellules dendritiques différenciées.

Ces cellules dendritiques ainsi obtenues, sont ensuite traitées avec une dose de 3  $\mu$ g/ml de E7 natif, ou de E7  $\Delta$ 21-26 et/ou du milieu de culture, puis cocultivées dans plaques 96 puits à fond rond avec les PBMCs du même donneur dans les rapports 1/10 ; 3/10 et 10/10. 18 heures avant la fin de la réaction, 0.5  $\mu$ Ci de thymidine tritiée/ puits sont ajoutés. Les résultats, donnés en coup par minute, sont présentés dans la Figure 18.

Lorsque les cellules dendritiques sont pré-incubées avec la protéine E7 native, puis cultivées avec les cellules répondantes, aucune prolifération n'est observée. (à cause de l'activité immunosuppressive de la protéine E7

native). Lorsque les cellules dendritiques sont pré-incubées avec la protéine E7 mutée (dépourvue de l'activité immunosuppressive de la protéine native), une prolifération des stimulantes est observée.

5 **Exemple 6 : Absence d'activité immunosuppressive des protéines E7 mutées.**

L'absence d'activité immunosuppressive in vitro a été mesurée à l'aide d'un test de prolifération cellulaire. Des cellules mononucléées du sang périphérique humain sont isolées puis cultivées dans des puits à fond rond à  
10 raison de 150 000 cellules/puits en présence de 3 µg/ml de différentes protéines E7 natives et de leur mutant respectif ou en présence de surnageant (SN) de culture de vaccine E7 HPV 16 (Δ21-25), don de MP Kieny, Transgène et en présence d'antigène de rappel (PPD + TT). La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5  
15 % de CO<sub>2</sub> pendant 6 jours. La prolifération cellulaire est mesurée par le test d'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats, donnés en coups par minute sont résumés dans le Tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2**

20

| Contrôle milieu                    | 25 000 | 40 000 | 33 000 | 45 000 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| PD1/3-HPV16-E7                     | 5 000  |        |        |        |
| PD1/3-HPV16-E7 mutant (C24G; E26Q) | 20 000 |        |        |        |
| His-HPV16-E7                       |        | 10 000 |        |        |
| His-HPV16-E7 mutant (C24S; E26Q)   |        | 35 000 |        |        |
| His-HPV16-E7                       |        |        | 7 500  |        |
| His-HPV16-E7 mutant (Δ21-26)       |        |        | 30 000 |        |
| SN de vaccine E7 HPV 16 (Δ21-25)   |        |        |        | 40 000 |

Les résultats obtenus montrent que les mutants ont été détoxifiés (perte de l'activité immunosuppressive de la protéine native)

## **REFERENCES**

- AUSUBEL F M, Brent R. Kingstone Re, Moore DD, Seidaman JG, Smith JA Struhl K editors , (1989), Current protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience.
- 5 • AUCOUTURIER et al., 2001, Vaccine, 19 : 2666-2672.
- BARAS et al., 1999, Infect. Immun., 67: 2643-2648.
- BASAK et al., 1995, J. Pept. Sci., 1(6): 383-395.
- CHEN et al., 1987, Mol. Cell. Biol. Vol.7: 2745-2752.
- 10 • CRUZ , I. et al., 1999, Br. J. Cancer, vol.81 ; 881-889.
- De SMEDT, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. J.Exp.Med. 184:1413-1424.
- 15 • EL SHERIF AM et al., 2001, J. Pathol, 195(2): 179-185
- FRANKEL et al., 1988, Cell, vol.55.
- FELTKAMP, M.C., H.L. Smits, M.P. Vierboom, R.P. Minnaar, B.M. de Jongh, J.W. Drijfhout, J. ter Schegget, C.J. Melief, and W.M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur.J.Immunol. 23:2242-2249.
- 20 • FRALEY 1980, J. Biol. Chem., vol.255:10431.
- FLOTTE et al., 1992, Am. J. Respir. cell Mol. Biol., vol. 7: 349-356
- GAIT (ed.), 1984, Nucleic acid hybridization.
- 25 • GERARD C M, 2001, Vaccine, vol.19 : 2583-2589.
- GIANNINI et al., 1998, Clin. EXP. Immunol, 113(2) : 183-189.
- GIANNINI ET AL., 2002, Int. J. CANCER , 97(5) : 654-659.
- GOPAL 1985, Mol. Cell. Biol., vol.5: 1188-1190.
- GLOVER (ed.), 1985, DNA Cloning: A practical approach, vol. I and II. Oligonucleotide synthesis, MRL Press, Ltd, Oxford, U.K.
- 30 • GRAHAM et al., 1973, Virology, vol.52: 456-457.

- HOUBEN WEYL, 1974, In Methode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.
- HUYGEN et al., 1996, Nature Medicine, vol.2 (8) : 893-898.
- HARLAND et al. , 1985, J. Cell. Biol. vol.101 :1094-1095.
- 5 • KIEFER H. et al., 1996, Biochemistry, vol. 35(50):16077-16084.
- MCLAUGHLIN B A et al. , 1996, Am. J. Hum. Genet , vol.59:561-569.
- MERRIFIELD RB, 1965a, Nature, vol. 207(996):522-523.
- MERRIFIELD, 1965b, Science, vol. 150(693):178-185.
- 10 • MUDERSPACH L. et al., 2000, Clinical Cancer Research, vol.6: 3406-3416.
- NICOLAU et al. , 1987, Methods enzymol., vol.149: 157-176.
- OSEN W et al., 2001, Vaccine, vol.19: 4276-4286.
- POTTER et al., 1984, Proc. Natl. Acad. sci. USA, vol.81 (22): 7161-7165.
- 15 • TUCKER J., GRISSHAMMER R., Biochem J., 1996, vol., 317(Pt3):891-899.
- SAMBROOK J FRITSCH E F et MANIATIS T, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor , New York .
- SAMULSKI et al. 1989, J. Virol. , vol.63 :3822-3828.
- 20 • SCHOELL W M J, 1999, Gynecologic Oncology, vol.74: 448-455.
- SEEDORF K, 1985, Virology, vol. 145 (1): 181-185.
- SKAUGRUD et al. 1999, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 16: 23-40.
- TACSON et al., 1996, Nature Medicine, vol.2 (8) : 888-892.
- TUR-KASPA, 1986, Mol. Cell. Biol., vol.6: 716-718.



## **REVENDICATIONS**

1. Composition vaccinale dépourvue de propriété immunosuppressive, préventive ou curative à l'égard d'un cancer provoqué par une infection à *Papillomavirus*, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive comprenant la séquence en acides aminés qui consiste, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, en :
- (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ;
  - (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ; et
  - (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3,
- en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.
2. Composition vaccinale selon la revendication 1, dans laquelle la protéine E7 mutée est caractérisée en ce que la région (ii) d'acides aminés de ladite protéine E7 mutée comprend au moins deux substitutions d'acides aminés, par rapport aux acides aminés correspondants de la région peptidique 20-29 de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine native.
3. Composition vaccinale selon la revendication 2, dans laquelle la protéine E7 mutée est caractérisée en ce que la région (ii) d'acides aminés de ladite protéine E7 mutée comprend trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf ou dix substitutions d'acides aminés, par rapport aux acides aminés correspondants de la région peptidique 20-29 de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine native.

4. Composition vaccinale selon la revendication 2, dans laquelle la protéine E7 mutée est caractérisée en ce que les résidus Cys en position 24 et Glu en position 26 ont été substitués par un résidu d'acide aminé distinct.
- 5 5. Composition vaccinale selon la revendication 4, dans laquelle la protéine E7 mutée est la protéine E7 (CYS24GLY, GLU26GLN).
6. Composition vaccinale selon la revendication 4, dans laquelle la protéine E7 mutée est la protéine E7 (CYS24SER, GLU26GLN).
- 10 7. Composition vaccinale selon la revendication 1, dans laquelle la protéine E7 mutée est caractérisée en ce que la région (ii) d'acides aminés de ladite protéine E7 mutée comprend la délétion de cinq, six, sept, huit, neuf ou dix acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante
- 15 d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3.
8. Composition vaccinale selon la revendication 7, dans laquelle la protéine E7 mutée est caractérisée en ce que la région (ii) d'acides aminés de ladite protéine E7 mutée comprend la délétion de six acides aminés consécutifs,
- 20 par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3.
9. Composition selon la revendication 8, dans laquelle la protéine E7 mutée consiste en la protéine consiste en la protéine E7 mutée dont la séquence
- 25 d'acides aminés comprend la délétion des acides aminés 21 à 26 correspondants de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine E7 native
10. Composition vaccinale selon la revendication 7, dans laquelle la protéine E7 mutée est caractérisée en ce que la région (ii) d'acides aminés de ladite
- 30 protéine E7 mutée comprend la délétion de cinq acides aminés consécutifs,

par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3.

11. Composition vaccinale selon la revendication 10, dans laquelle la protéine E7 mutée consiste en la protéine E7 mutée dont la séquence d'acides aminés comprend la délétion des acides aminés 21 à 25 correspondants de la séquence SEQ ID N° 3 de la protéine E7 native

12. Composition vaccinale selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps neutralisant l'activité immunosuppressive de la protéine E7 native.

13. Composition vaccinale selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgA.

14. Composition vaccinale selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production, d'anticorps d'isotype IgG.

15. Composition vaccinale selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend la combinaison (i) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgA et (ii) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production, d'anticorps d'isotype IgG.

16. Composition vaccinale selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant de l'immunité susceptible d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire.

5 17. Composition vaccinale selon la revendication 7, caractérisée en ce que la réponse cellulaire est caractérisée notamment par la prolifération de lymphocytes exprimant l'antigène CD8 et reconnaissant spécifiquement la protéine E7 sauvage.

10 18. Composition immunogène induisant une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7 native du Papillomavirus HPV-16, sans induire simultanément une immunosuppression, ladite composition comprenant, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive dont la séquence en acides aminés consiste, de l'extrémité N-terminale, vers  
15 l'extrémité C-terminale, en :

- (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ;
- (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins  
20 quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ; et
- (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3,

en association avec un ou plusieurs excipients ou adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles. .

25

19. Composition vaccinale préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité immunologiquement efficace d'un acide nucléique codant une protéine E7 mutée telle que définie selon l'une des revendications 1 à 11, d'une cassette  
30 d'expression comprenant ledit acide nucléique ou d'un vecteur recombinant comprenant ladite cassette d'expression..

20. Utilisation d'une protéine E7 mutée non immunosuppressive telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour la fabrication d'une composition immunogène ou d'une composition vaccinale non immunosuppressive et qui induit la production d'anticorps neutralisant l'activité immunosuppressive de la protéine E7 native.

21. Anticorps neutralisants dirigés contre le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée telle que définie selon l'une des revendications 1 à 11 .

22. Composition pour vaccination passive à l'encontre d'une infection par HPV-16 contenant des anticorps selon la revendication 21.

23. Composition vaccinale dépourvue de propriété immunosuppressive, préventive ou curative à l'égard d'un cancer provoqué par une infection à *Papillomavirus*, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, une quantité appropriée de cellules dendritiques autologues ou allogéniques vis-à-vis de l'individu à traiter, lesdites cellules dendritiques autologues ayant été incubées avec une protéine E7 mutée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 11 et ainsi rendues aptes à présenter ladite protéine E7 mutée aux cellules T.

1/13

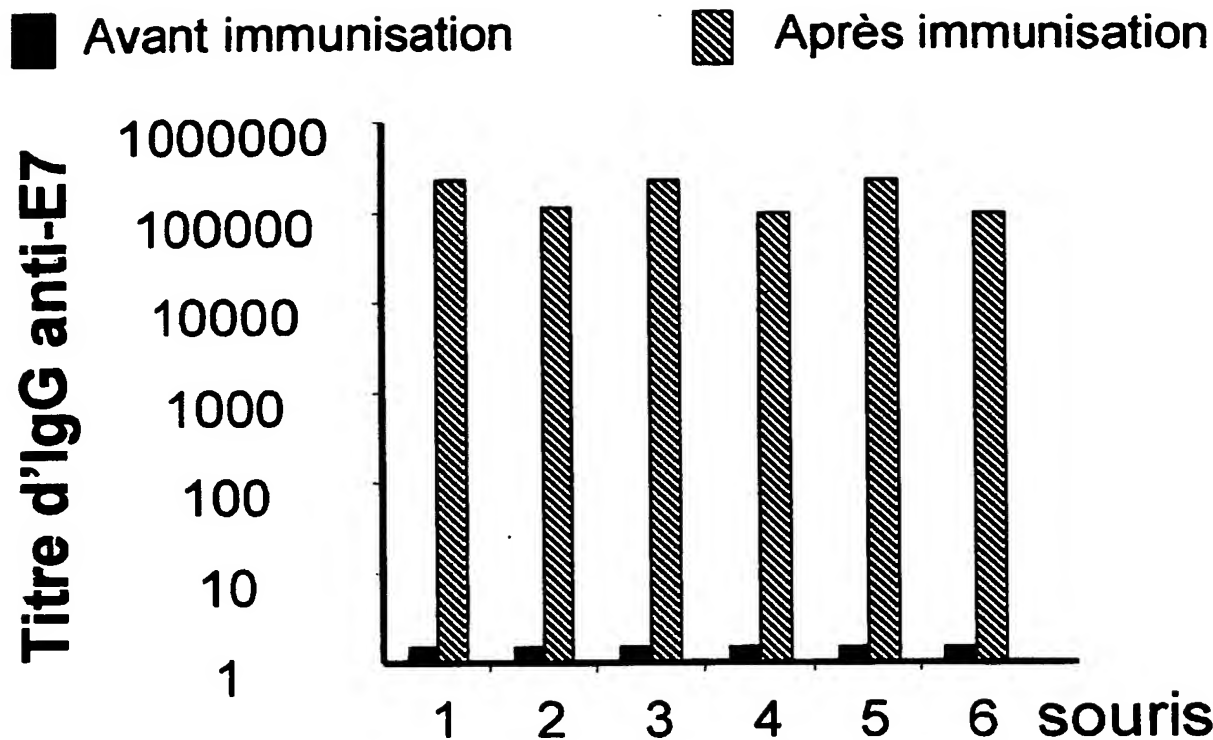


FIGURE 1

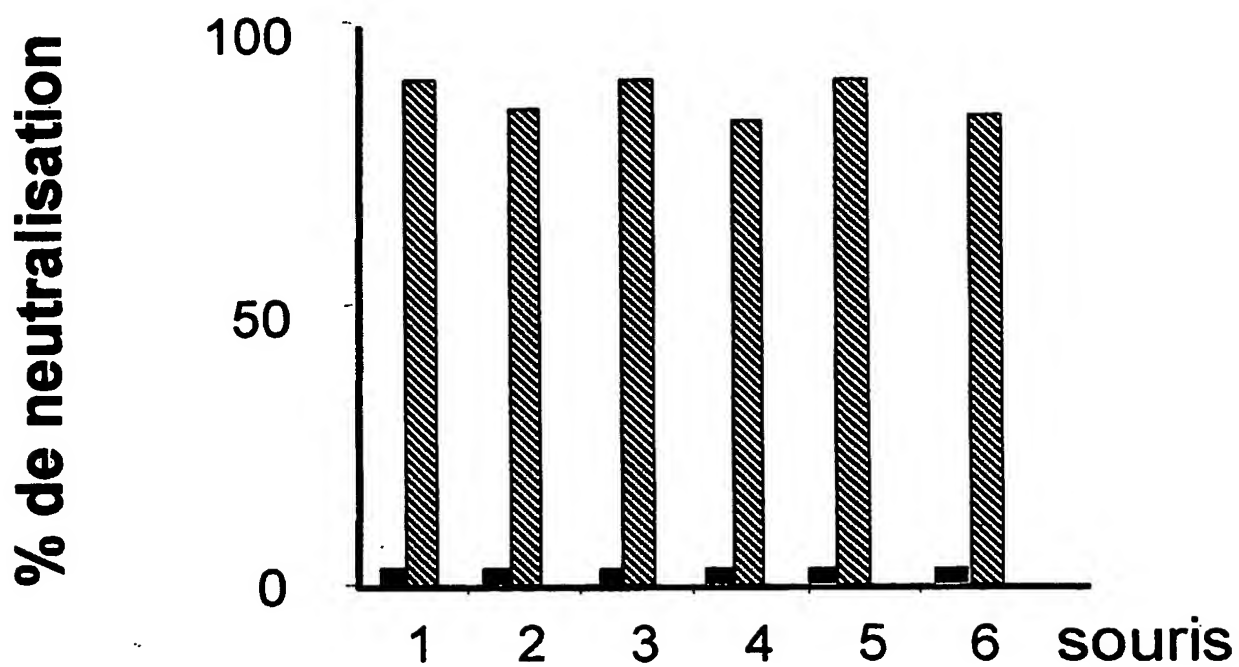


FIGURE 2

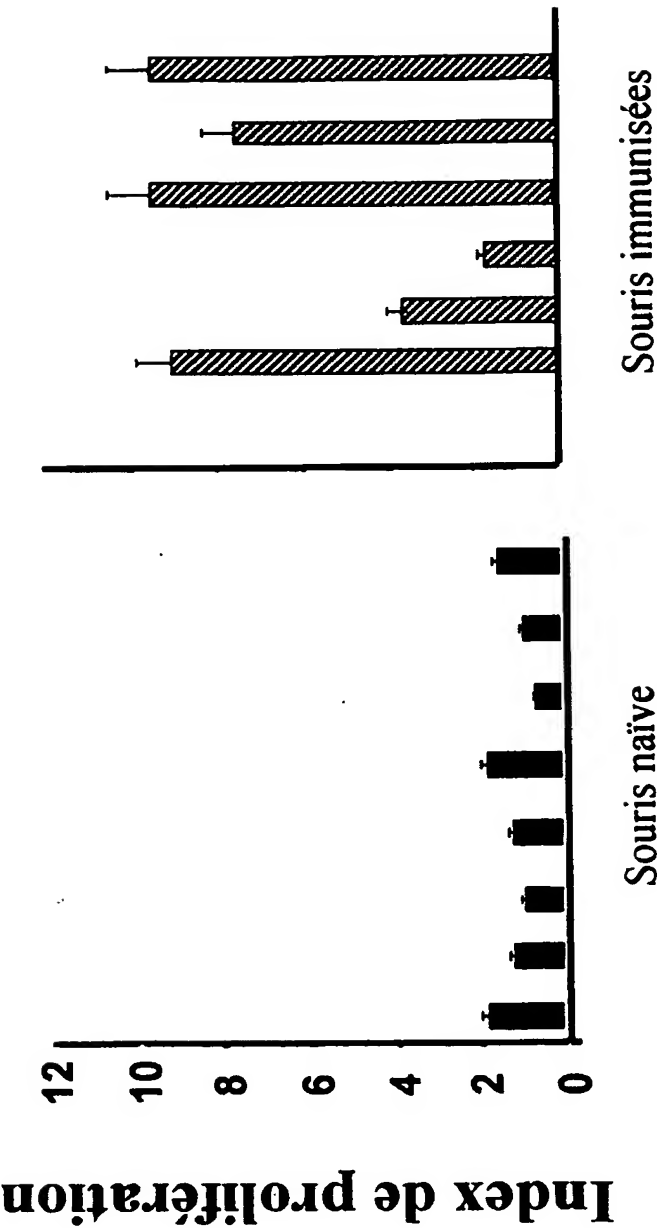


FIGURE 3

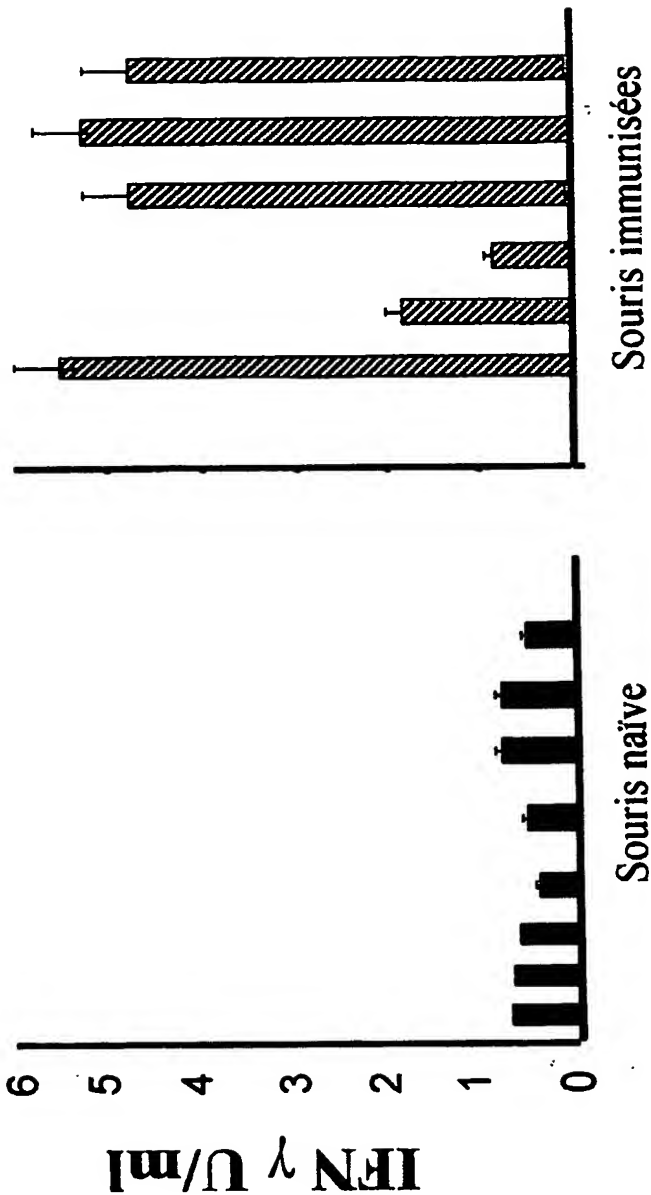


FIGURE 4



4/13

■ Avant immunisation      ▨ Après immunisation

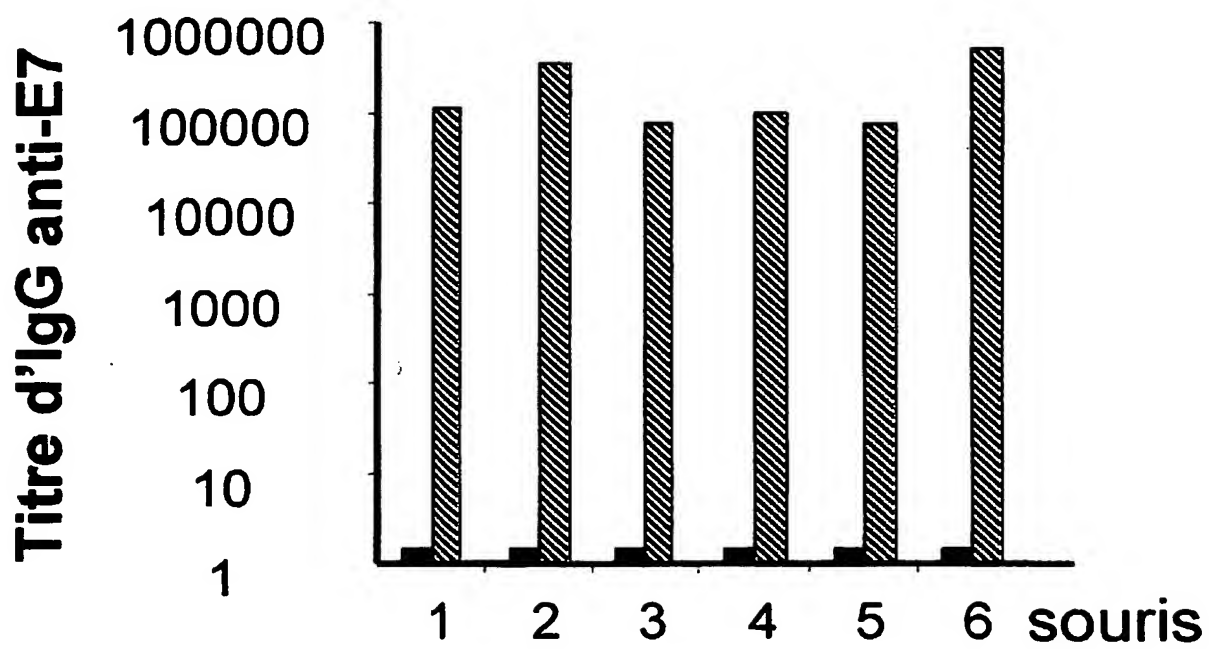


FIGURE 5

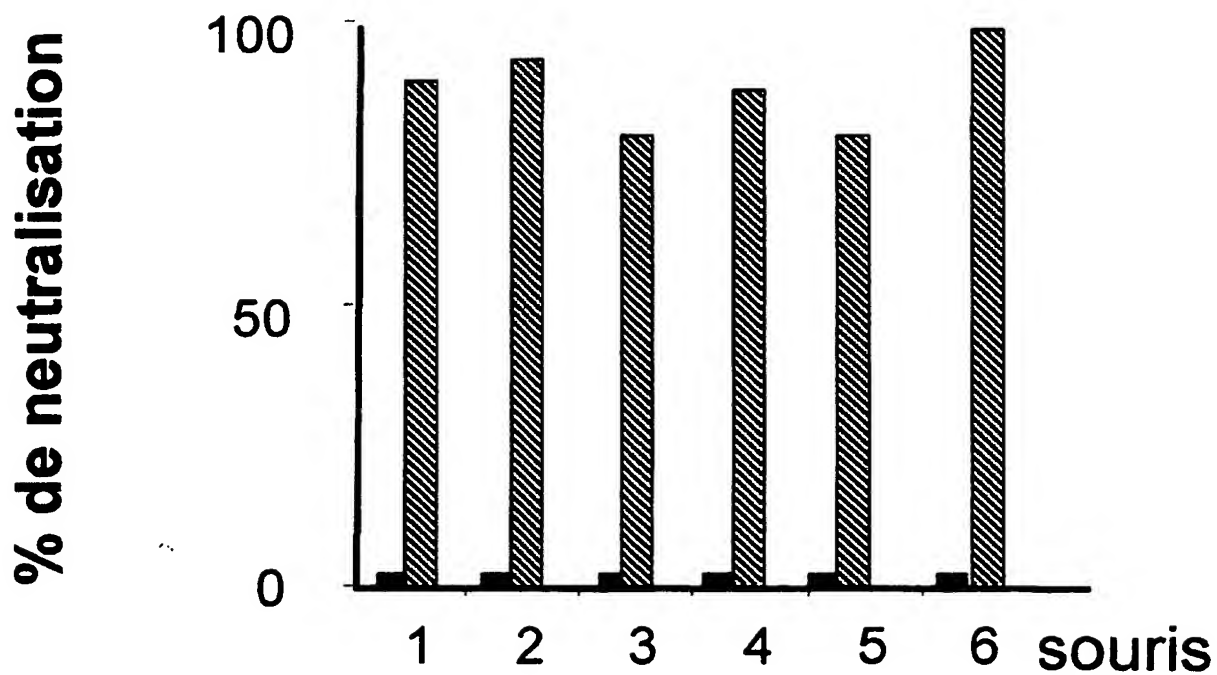


FIGURE 6

5/13

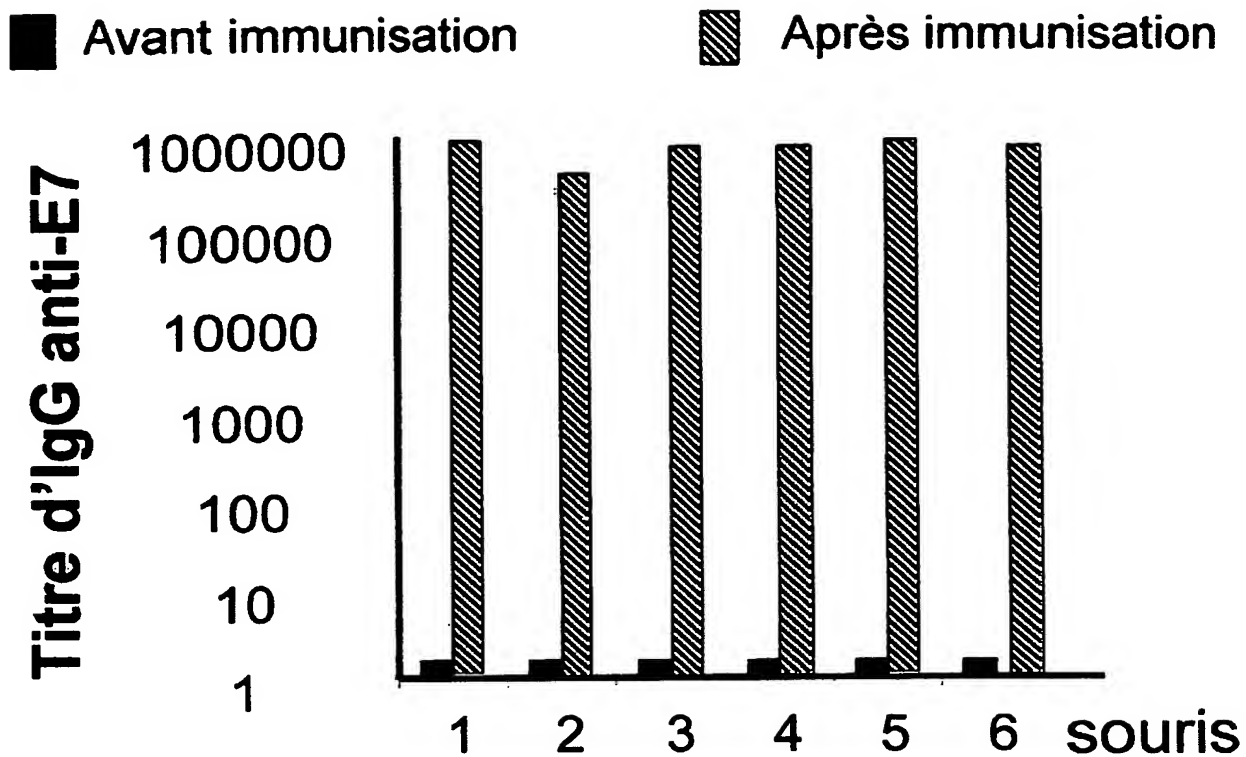


FIGURE 7

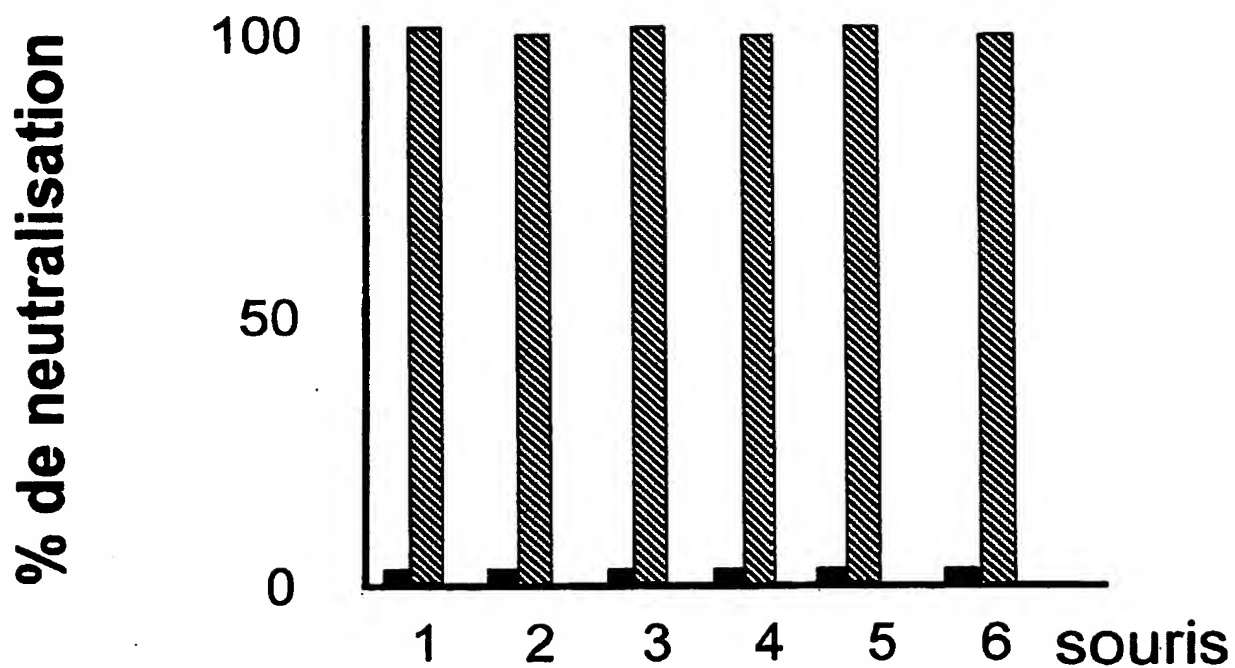


FIGURE 8

6/13

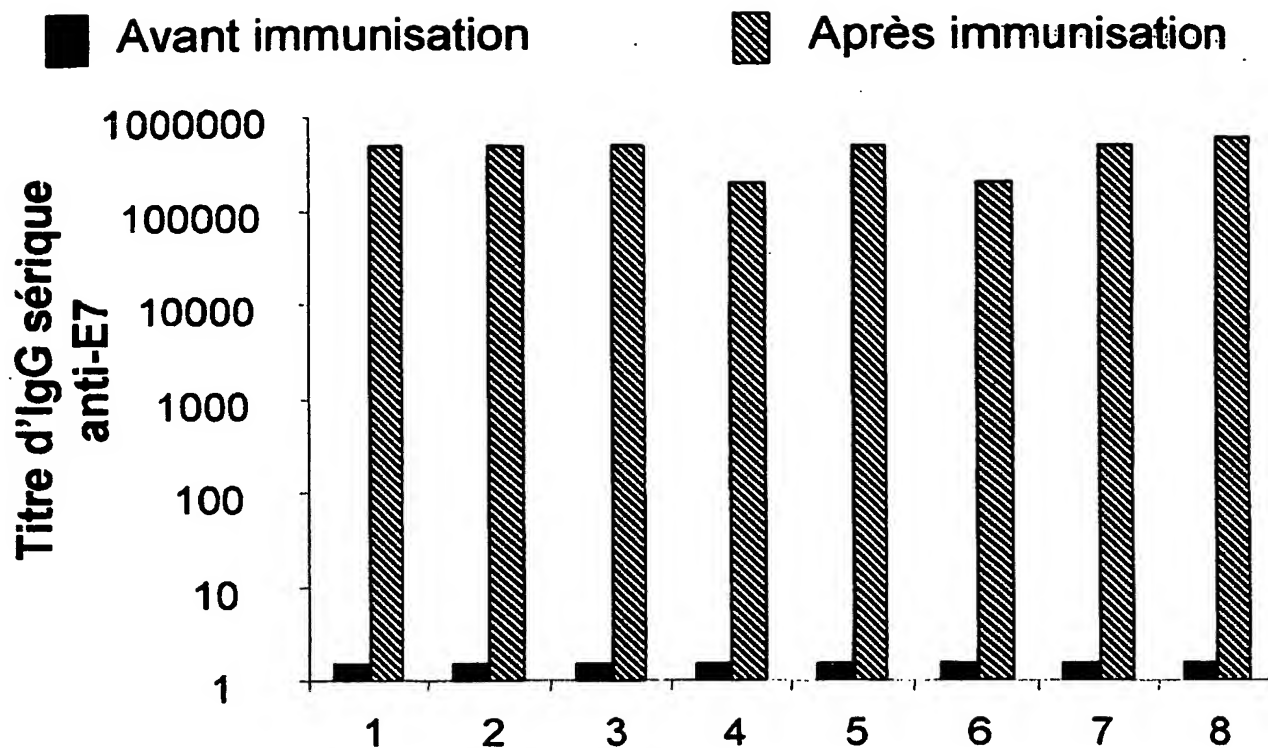


FIGURE 9

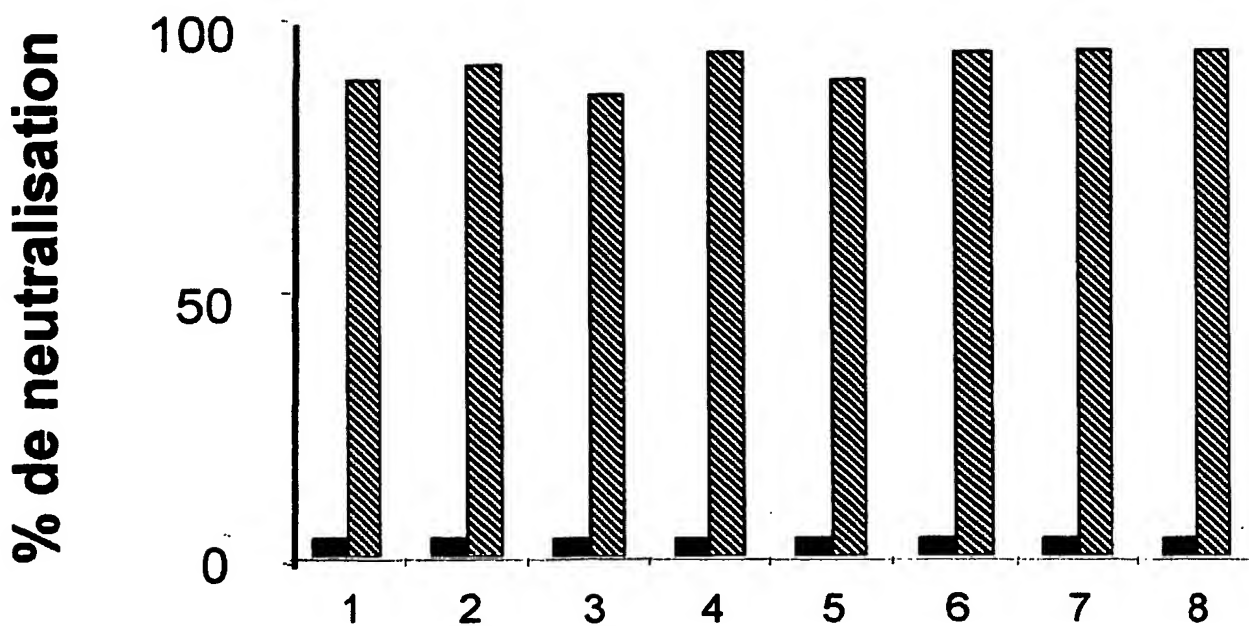


FIGURE 10

7/13

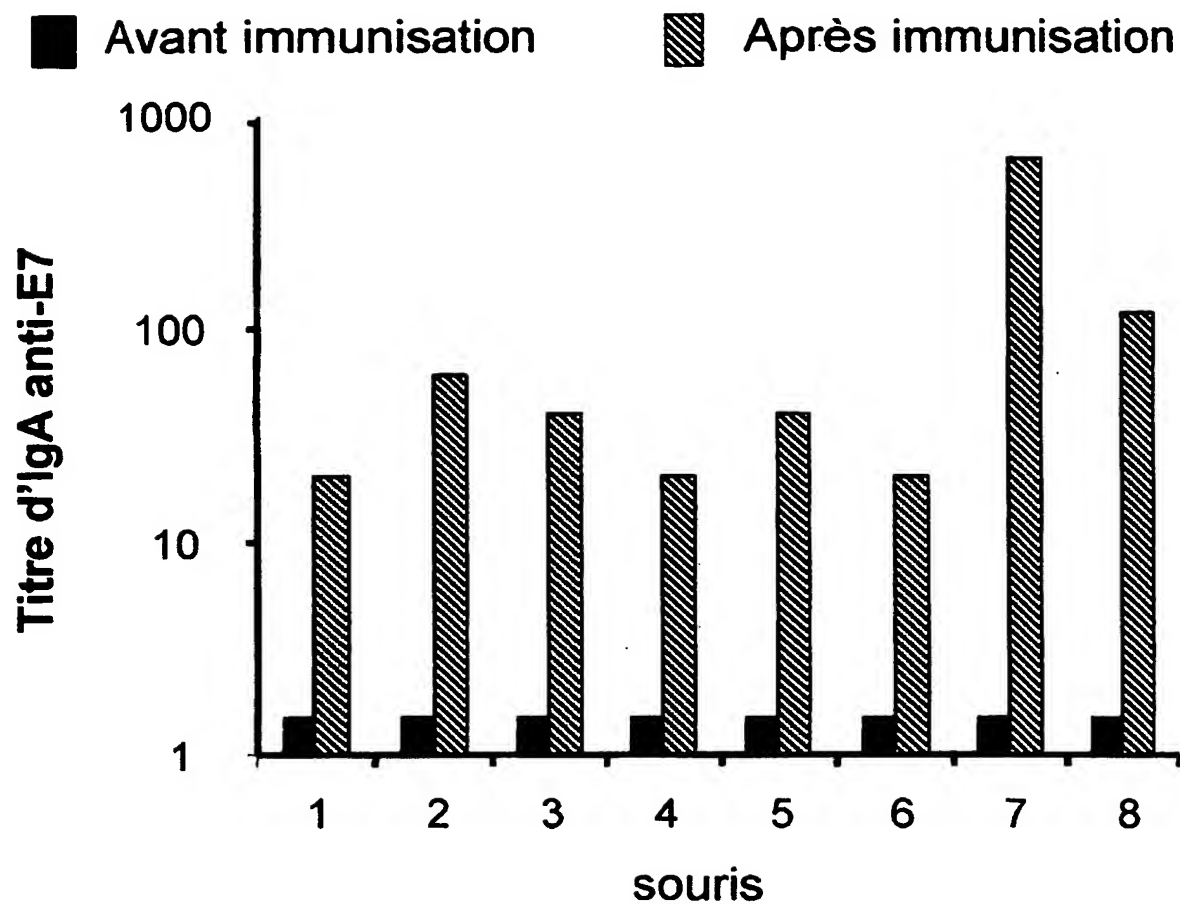


FIGURE 11

8/13

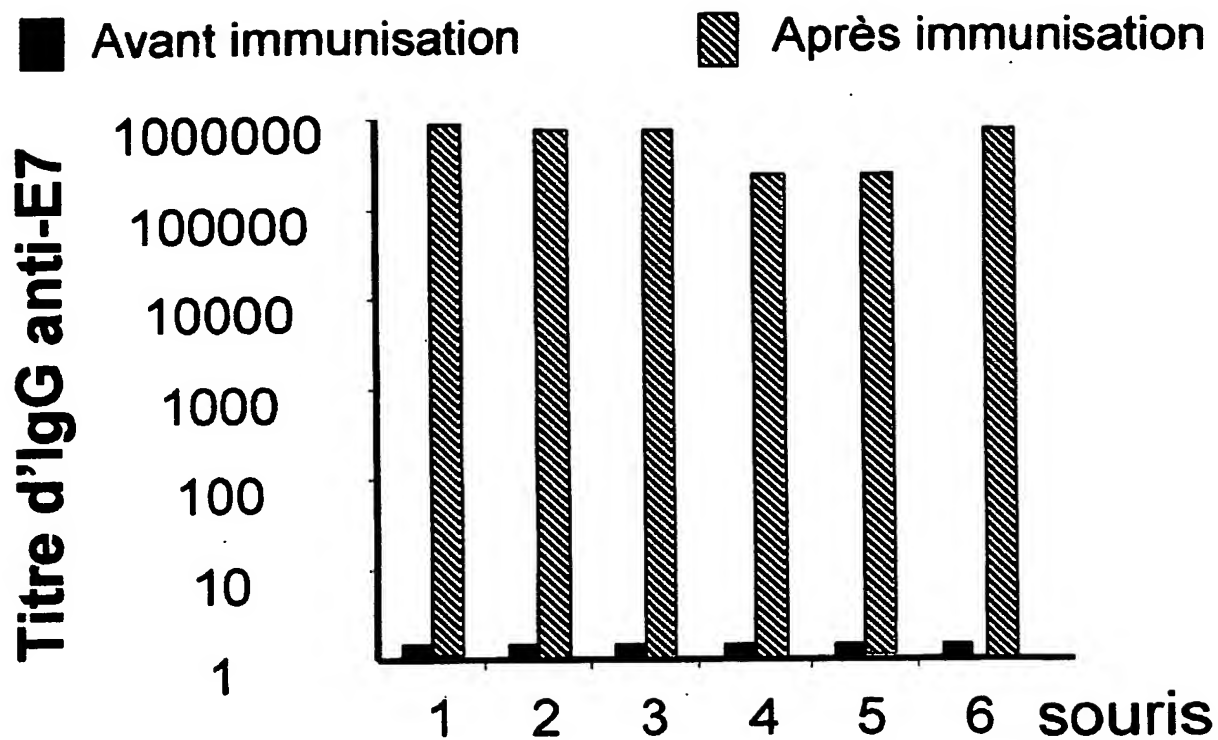


FIGURE 12

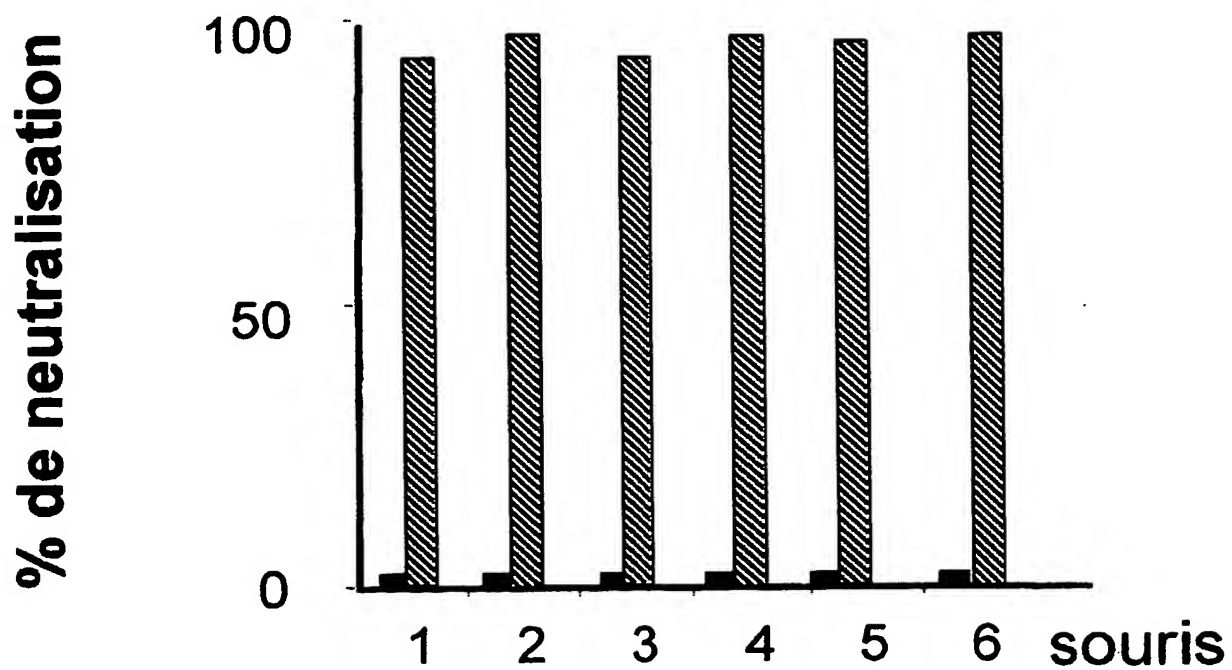


FIGURE 13

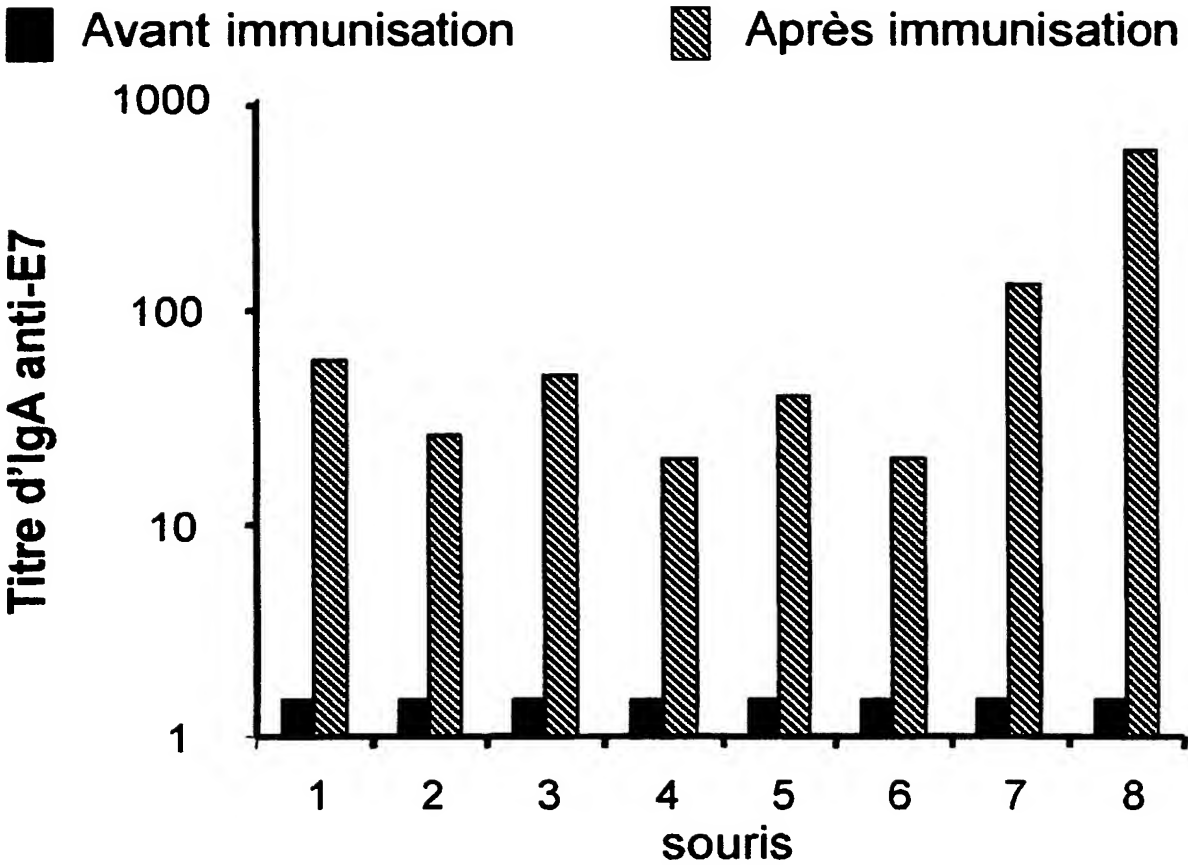


FIGURE 14

10/13

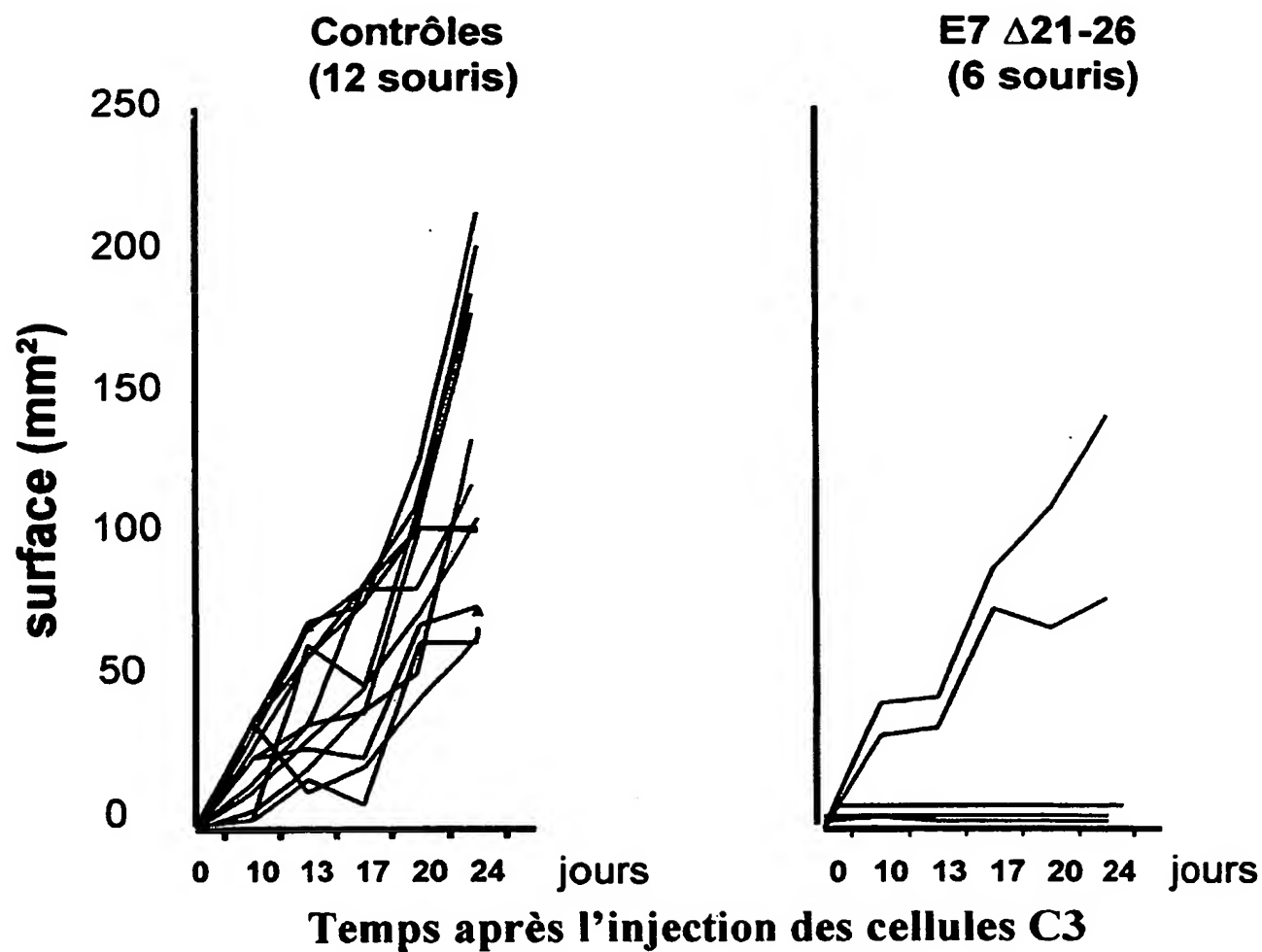


FIGURE 15

11/13

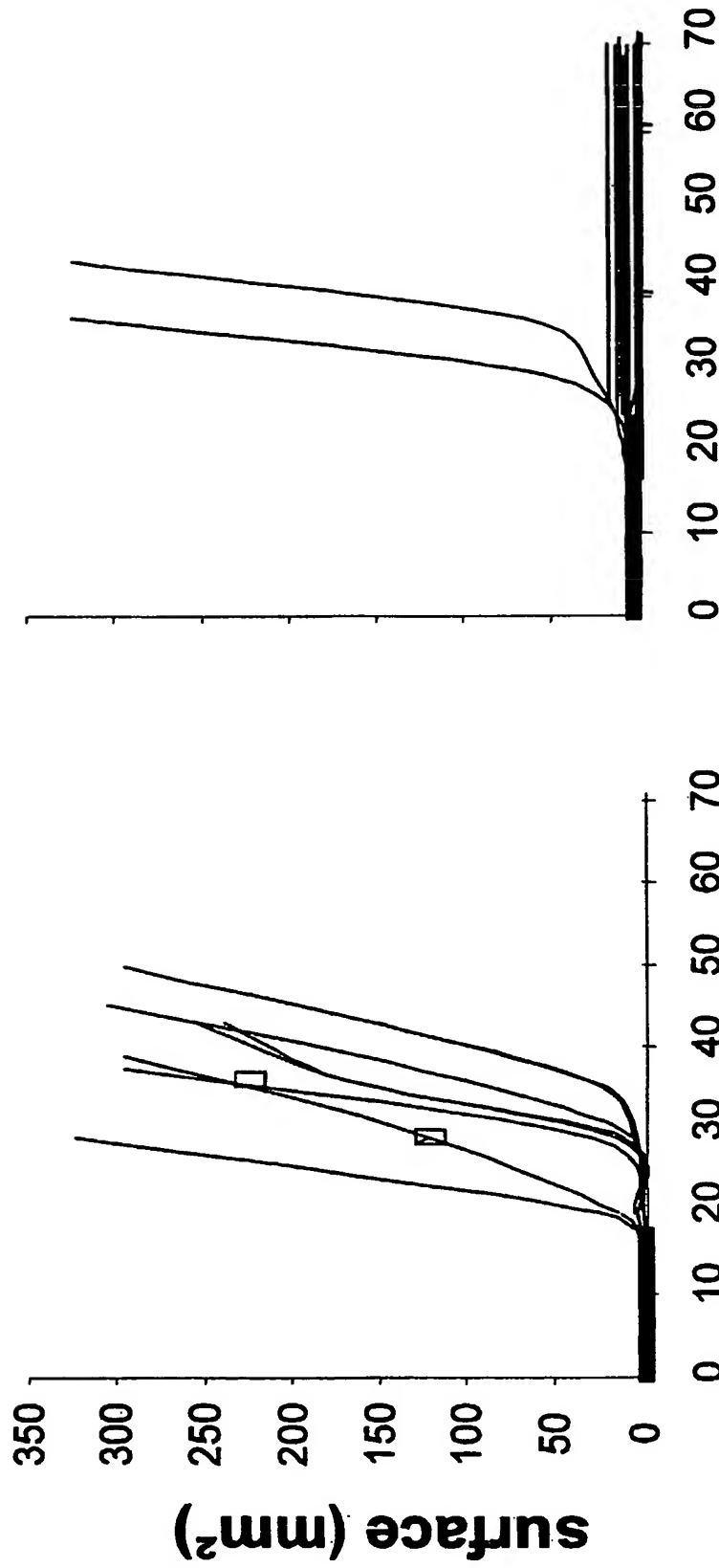


FIGURE 16A

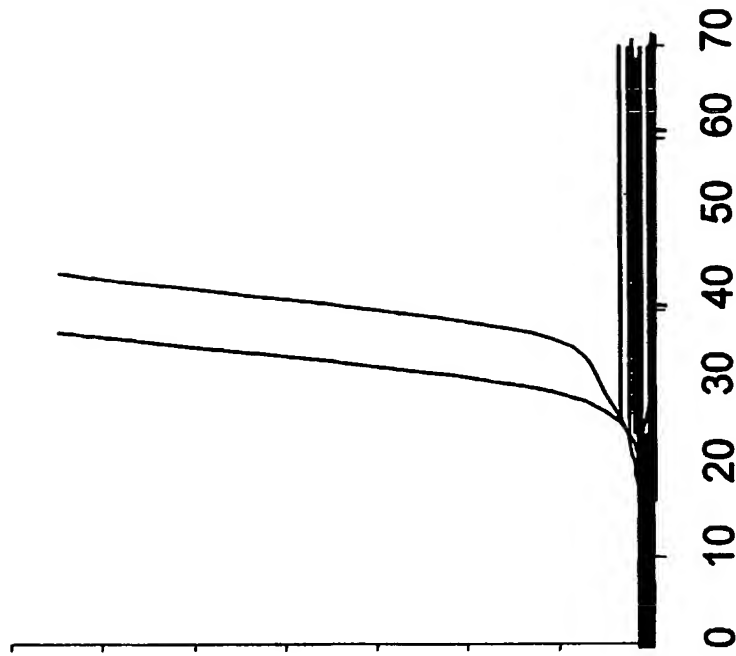


FIGURE 16B



12/13

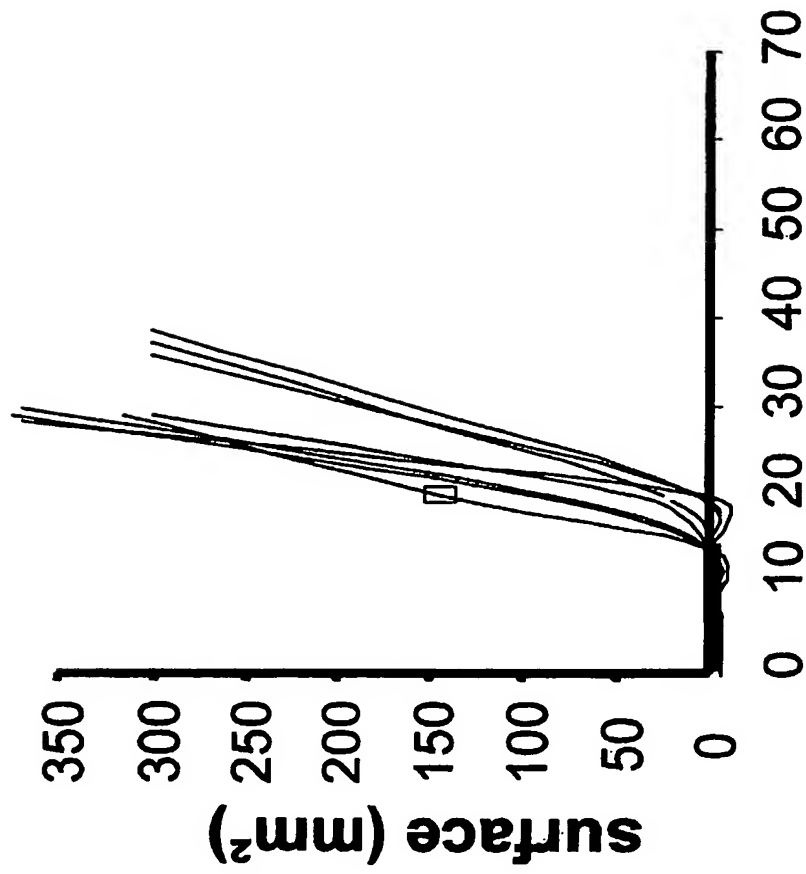


FIGURE 17A

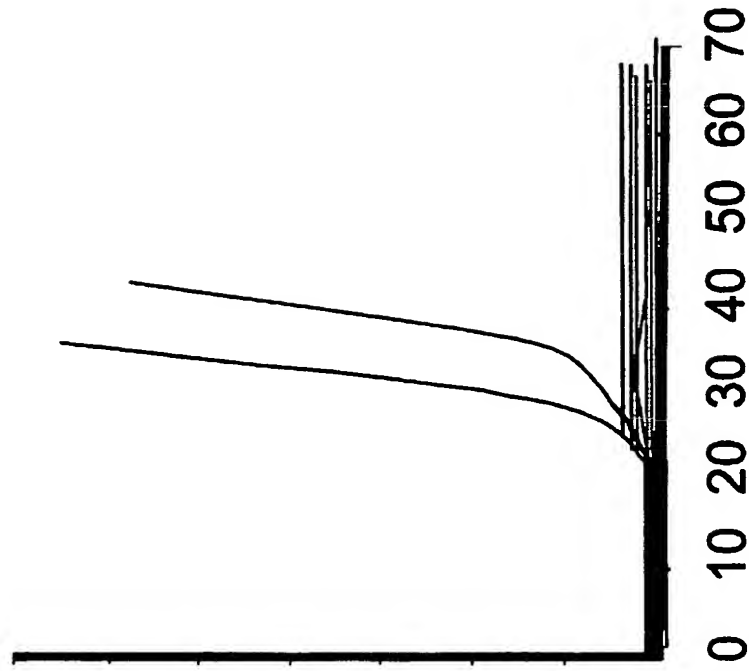


FIGURE 17B

13/13

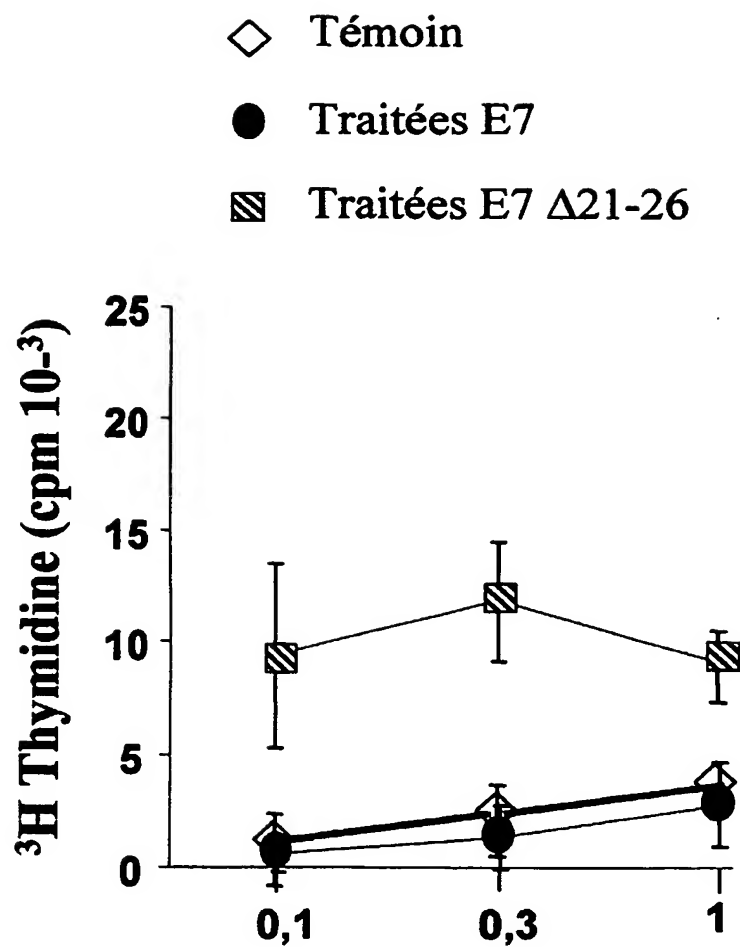


FIGURE 18

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; NEOVACS

<120> Composition immunogène ou vaccinale non  
ummunosuppressive, comprenant une protéine E7 mutée du  
virus HPV-16

&lt;130&gt; NEOVACS - N729-PCT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR0205173

&lt;151&gt; 2002-04-24

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 92

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence  
artificielle:E7-delta-21-26

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | Gly | Asp | Thr | Pro | Thr | Leu | His | Glu | Tyr | Met | Leu | Asp | Leu | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Glu | Thr | Thr | Gln | Leu | Asn | Asp | Ser | Ser | Glu | Glu | Glu | Asp | Glu | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Gly | Pro | Ala | Gly | Gln | Ala | Glu | Pro | Asp | Arg | Ala | His | Tyr | Asn | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Thr | Phe | Cys | Cys | Lys | Cys | Asp | Ser | Thr | Leu | Arg | Leu | Cys | Val | Gln |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Thr | His | Val | Asp | Ile | Cys | Thr | Leu | Glu | Asp | Leu | Leu | Met | Gly | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gly | Ile | Val | Cys | Pro | Ile | Cys | Ser | Arg | Lys | Pro |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence  
artificielle:E7-delta-21-26

&lt;400&gt; 2

catggagata cacctacatt gcatgaatat atggttagatt tgcaaccaga gacaactcaa 60

```

ttaaattgaca gctcagagga ggaggatgaa atagatggtc cagctggaca agcagaaccg 120
gacagagccc attacaatat tgtaaccttt tgttgcaagt gtgactctac gcttcgggtg 180
tgcgtacaaa gcacacacgt agacattcgt actttggaag acctgttaat gggcacacta 240
ggaattgtgt gccccatctg ttctcagaaa ccataa 276

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human papillomavirus type 16

&lt;400&gt; 3

```

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
  1              5              10              15

```

```

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
      20              25              30

```

```

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
  35              40              45

```

```

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
  50              55              60

```

```

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Cys Thr Leu Glu
  65              70              75              80

```

```

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Arg
      85              90              95

```

Lys Pro

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 294

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Human papillomavirus type 16

&lt;400&gt; 4

```

catggagata cacctacatt gcatgaatat atggttagatt tgcaaccaga gacaactgat 60
ctctactgtt atgagcaatt aaatgacagc tcagaggagg aggatgaaat agatgggtcca 120
gctggacaag cagaaccgga cagagcccat tacaatattg taaccttttg ttgcaagtgt 180
gactctacgc ttcggttggt cgtacaaagc acacacgtag acattcgtac tttggaagac 240
ctgttaatgg gcacactagg aattgtgtgc cccatctgtt ctcagaaacc ataa 294

```

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2003/090667 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

**C07K 14/025**, A61K 38/16, 39/23

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/001082

(22) Date de dépôt international : 4 avril 2003 (04.04.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/05173

24 avril 2002 (24.04.2002)

FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : NEO-VACS [FR/FR]; 59, avenue Victor Hugo, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ZAGURY, Daniel [FR/FR]; 1 avenue Frédéric Le Play, F-75007 Paris (FR). LE BUANEC, Hélène [FR/FR]; 29, rue Poliveau, F-75005 Paris (FR). BIZZINI, Bernard [FR/FR]; 65, rue Roc, F-81000 Albi (FR). COHEN, Paul [FR/FR]; 21 quai de Bourbon, F-75004 Paris (FR).

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet Harlé & Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

1 avril 2004

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: NON-IMMUNOSUPPRESSIVE IMMUNOGENIC OR VACCINE COMPOSITION COMPRISING A MUTATED E7 PROTEIN OF THE HPV-16 VIRUS

(54) Titre : COMPOSITION IMMUNOGENE OU VACCINALE NON IMMUNOSUPPRESSIVE, COMPRENANT UNE PROTEINE E7 MUTEE DU VIRUS HPV-16

(57) Abstract: The invention concerns an immunogenic or vaccine composition inducing an immune response against the native E7 protein of *Papillomavirus* HPV-16, without simultaneously inducing immunosuppression, said composition comprising, as active principle, a non-immunosuppressive mutated E7 protein comprising the amino acid sequence consisting, from the N-terminal, towards the C-terminal, of: (i) amino acid sequences 1-19 of sequence SEQ ID N°3; (ii) an amino acid sequence having (a) substitution of at least one amino acid, relative to the corresponding sequence of amino acids 20-29 of sequence SEQ ID N°3 or (b) deletion of at least four consecutive amino acids, relative to the corresponding sequence of amino acids 20-29 of sequence SEQ ID N°3; and (iii) the sequence of amino acids 30-98 of sequence SEQ ID N°3.

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition immunogène ou vaccinale induisant une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7 native du Papillomavirus HPV-16, sans induire simultanément une immunosuppression, ladite composition comprenant, à titre de principe actif, une protéine E7 mutée non immunosuppressive comprenant la séquence en acides aminés qui consiste, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, en : (i) la séquence d'acides aminés 1-19 de la séquence SEQ ID N°3 ; (ii) une séquence d'acides aminés possédant (a) la substitution d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 ou (b) la délétion d'au moins quatre acides aminés consécutifs, par rapport à la séquence correspondante d'acides aminés 20-29 de la séquence SEQ ID N°3 , et (iii) la séquence d'acides aminés 30-98 de la séquence SEQ ID N°3.

WO 2003/090667 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01082

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/025 A61K38/16 A61K39/23

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | WO 99 10375 A (LOMBARDO BENCHEIKH ANGELA ; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); BRUCK C)<br>4 March 1999 (1999-03-04)<br>the whole document | 1-23                  |
| A          | US 6 235 523 B1 (GAJEWCZYK DIANE M ET AL)<br>22 May 2001 (2001-05-22)<br>the whole document  | 1-23                  |
| A          | FR 2 794 371 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS)<br>8 December 2000 (2000-12-08)<br>the whole document  | 1-23                  |
| A          | WO 96 19496 A (EDWARDS STIRLING JOHN ; CSL LTD (AU); COX JOHN COOPER (AU); FRAZER)<br>27 June 1996 (1996-06-27)<br>claims              | 1-23                  |
|            | ---<br>-/-   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, K-P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01082

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | <p>EP 0 451 550 A (BEHRINGWERKE AG)<br/> 16 October 1991 (1991-10-16)<br/> page 2, line 38 - line 41<br/> page 2, line 55 -page 5, line 14<br/> claims 1,3,4,8-14; example 5; table 1</p> | 1-23                  |
| A          | <p>WO 01 14416 A (CHEN LING ;MERCK &amp; CO INC<br/> (US); SCHULTZ LOREN D (US); WANG XIN MIN)<br/> 1 March 2001 (2001-03-01)<br/> claims 1-4,19-30</p>                                   | 1-23                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01082

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9910375                                | A  | 04-03-1999          | AU 732946 B2               | 03-05-2001          |
|   |    |                     | AU 9263998 A               | 16-03-1999          |
|   |    |                     | BR 9812139 A               | 18-07-2000          |
|   |    |                     | CA 2301920 A1              | 04-03-1999          |
|   |    |                     | CN 1276833 T               | 13-12-2000          |
|   |    |                     | WO 9910375 A2              | 04-03-1999          |
|   |    |                     | EP 1007551 A2              | 14-06-2000          |
|   |    |                     | HU 0004327 A2              | 28-03-2001          |
|   |    |                     | JP 2001513986 T            | 11-09-2001          |
|   |    |                     | NO 20000850 A              | 14-04-2000          |
|   |    |                     | NZ 502632 A                | 28-03-2002          |
|   |    |                     | PL 339009 A1               | 04-12-2000          |
|   |    |                     | TR 200000480 T2            | 21-07-2000          |
|   |    |                     | US 2002182221 A1           | 05-12-2002          |
|   |    |                     | US 6342224 B1              | 29-01-2002          |
|   |    |                     | ZA 9807591 A               | 21-02-2000          |
| US 6235523                                | B1 | 22-05-2001          | AU 5611899 A               | 27-03-2000          |
|   |    |                     | CA 2342289 A1              | 16-03-2000          |
|   |    |                     | WO 0014244 A2              | 16-03-2000          |
|   |    |                     | EP 1108035 A2              | 20-06-2001          |
|   |    |                     | JP 2002524078 T            | 06-08-2002          |
|   |    |                     | NZ 510488 A                | 25-07-2003          |
| FR 2794371                                | A  | 08-12-2000          | FR 2794371 A1              | 08-12-2000          |
| WO 9619496                                | A  | 27-06-1996          | AU 693627 B2               | 02-07-1998          |
|   |    |                     | AU 4322996 A               | 10-07-1996          |
|   |    |                     | WO 9619496 A1              | 27-06-1996          |
|   |    |                     | CA 2207741 A1              | 27-06-1996          |
|   |    |                     | CA 2419289 A1              | 27-06-1996          |
|   |    |                     | EP 0796273 A1              | 24-09-1997          |
|   |    |                     | JP 10510989 T              | 27-10-1998          |
|   |    |                     | NZ 297946 A                | 28-01-2000          |
|   |    |                     | US 6303128 B1              | 16-10-2001          |
|   |    |                     | US 6306397 B1              | 23-10-2001          |
|   |    |                     | US 6004557 A               | 21-12-1999          |
|   |    |                     | ZA 9510832 A               | 04-07-1996          |
| EP 0451550                                | A  | 16-10-1991          | AU 650868 B2               | 07-07-1994          |
|   |    |                     | AU 7351591 A               | 26-09-1991          |
|   |    |                     | CA 2038581 A1              | 21-09-1991          |
|   |    |                     | EP 0451550 A2              | 16-10-1991          |
|   |    |                     | IE 910909 A1               | 25-09-1991          |
|   |    |                     | JP 4217998 A               | 07-08-1992          |
|   |    |                     | PT 97073 A                 | 31-10-1991          |
| WO 0114416                                | A  | 01-03-2001          | AU 7063900 A               | 19-03-2001          |
|   |    |                     | CA 2381991 A1              | 01-03-2001          |
|   |    |                     | EP 1212358 A2              | 12-06-2002          |
|   |    |                     | JP 2003511010 T            | 25-03-2003          |
|   |    |                     | WO 0114416 A2              | 01-03-2001          |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/01082

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C07K14/025 A61K38/16 A61K39/23

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| A           | WO 99 10375 A (LOMBARDO BENCHEIKH ANGELA ; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); BRUCK C)<br>4 mars 1999 (1999-03-04)<br>le document en entier | 1-23                          |
| A           | US 6 235 523 B1 (GAJEWCZYK DIANE M ET AL)<br>22 mai 2001 (2001-05-22)<br>le document en entier   | 1-23                          |
| A           | FR 2 794 371 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS)<br>8 décembre 2000 (2000-12-08)<br>le document en entier   | 1-23                          |
| A           | WO 96 19496 A (EDWARDS STIRLING JOHN ; CSL LTD (AU); COX JOHN COOPER (AU); FRAZER)<br>27 juin 1996 (1996-06-27)<br>revendications        | 1-23                          |
|             | ---<br>-/-   |                               |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 octobre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Döpfer, K-P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/01082

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A         | EP 0 451 550 A (BEHRINGWERKE AG)<br>16 octobre 1991 (1991-10-16)<br>page 2, ligne 38 - ligne 41<br>page 2, ligne 55 - page 5, ligne 14<br>revendications 1,3,4,8-14; exemple 5;<br>tableau 1 | 1-23                          |
| A         | WO 01 14416 A (CHEN LING ;MERCK & CO INC<br>(US); SCHULTZ LOREN D (US); WANG XIN MIN)<br>1 mars 2001 (2001-03-01)<br>revendications 1-4,19-30  | 1-23                          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/01082

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |    | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|----|------------------------|---|------------------------|
| WO 9910375                                      | A  | 04-03-1999             | AU 732946 B2                            | 03-05-2001             |
|   |    |                        | AU 9263998 A                            | 16-03-1999             |
|   |    |                        | BR 9812139 A                            | 18-07-2000             |
|   |    |                        | CA 2301920 A1                           | 04-03-1999             |
|   |    |                        | CN 1276833 T                            | 13-12-2000             |
|   |    |                        | WO 9910375 A2                           | 04-03-1999             |
|   |    |                        | EP 1007551 A2                           | 14-06-2000             |
|   |    |                        | HU 0004327 A2                           | 28-03-2001             |
|   |    |                        | JP 2001513986 T                         | 11-09-2001             |
|   |    |                        | NO 20000850 A                           | 14-04-2000             |
|   |    |                        | NZ 502632 A                             | 28-03-2002             |
|   |    |                        | PL 339009 A1                            | 04-12-2000             |
|   |    |                        | TR 200000480 T2                         | 21-07-2000             |
|   |    |                        | US 2002182221 A1                        | 05-12-2002             |
|   |    |                        | US 6342224 B1                           | 29-01-2002             |
|   |    |                        | ZA 9807591 A                            | 21-02-2000             |
| US 6235523                                      | B1 | 22-05-2001             | AU 5611899 A                            | 27-03-2000             |
|   |    |                        | CA 2342289 A1                           | 16-03-2000             |
|   |    |                        | WO 0014244 A2                           | 16-03-2000             |
|   |    |                        | EP 1108035 A2                           | 20-06-2001             |
|   |    |                        | JP 2002524078 T                         | 06-08-2002             |
|   |    |                        | NZ 510488 A                             | 25-07-2003             |
| FR 2794371                                      | A  | 08-12-2000             | FR 2794371 A1                           | 08-12-2000             |
| WO 9619496                                      | A  | 27-06-1996             | AU 693627 B2                            | 02-07-1998             |
|   |    |                        | AU 4322996 A                            | 10-07-1996             |
|   |    |                        | WO 9619496 A1                           | 27-06-1996             |
|   |    |                        | CA 2207741 A1                           | 27-06-1996             |
|   |    |                        | CA 2419289 A1                           | 27-06-1996             |
|   |    |                        | EP 0796273 A1                           | 24-09-1997             |
|   |    |                        | JP 10510989 T                           | 27-10-1998             |
|   |    |                        | NZ 297946 A                             | 28-01-2000             |
|   |    |                        | US 6303128 B1                           | 16-10-2001             |
|   |    |                        | US 6306397 B1                           | 23-10-2001             |
|   |    |                        | US 6004557 A                            | 21-12-1999             |
|   |    |                        | ZA 9510832 A                            | 04-07-1996             |
| EP 0451550                                      | A  | 16-10-1991             | AU 650868 B2                            | 07-07-1994             |
|   |    |                        | AU 7351591 A                            | 26-09-1991             |
|   |    |                        | CA 2038581 A1                           | 21-09-1991             |
|   |    |                        | EP 0451550 A2                           | 16-10-1991             |
|   |    |                        | IE 910909 A1                            | 25-09-1991             |
|   |    |                        | JP 4217998 A                            | 07-08-1992             |
|   |    |                        | PT 97073 A                              | 31-10-1991             |
| WO 0114416                                      | A  | 01-03-2001             | AU 7063900 A                            | 19-03-2001             |
|   |    |                        | CA 2381991 A1                           | 01-03-2001             |
|   |    |                        | EP 1212358 A2                           | 12-06-2002             |
|   |    |                        | JP 2003511010 T                         | 25-03-2003             |
|   |    |                        | WO 0114416 A2                           | 01-03-2001             |